

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Identificación y caracterización de los alérgenos principales de sandía

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Bárbara Cases Ortega

DIRECTORES:

Fernando, dir Vivanco Martínez
Carlos, dir Pastor Vargas

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5327641184

T577.27
CAS
ide

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Departamento de Bioquímica y Biología molecular I



**Identificación y Caracterización de los Alérgenos
principales de Sandía.**

1626503955

TESIS DOCTORAL

Bárbara Cases Ortega

Madrid, 2009



Vº Bº Directores de la tesis

Dr. Fernando Vivanco

Dr. Carlos Pastor

Dr. Javier Cuesta

**"Tras un año de investigación, uno cae en la cuenta de que podía haberse
hecho en una semana"**

(William Bragg)

A David.

A mi madre.

Agradecimientos:

Y ha llegado el momento tan esperado por todo doctorando (y tan temido por mí) de enfrentarse al folio en blanco de los agradecimientos... seguro que éstas son la páginas más leídas y eso da un poco de vértigo... Las personas que han estado conmigo en la elaboración de esta tesis son muchas y pido perdón si se me pasara mencionar a alguien, porque se lo agradezco a todos de corazón.

Para empezar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis: Javier, Fernando y Carlos. Habéis sido los mejores. Javier, gracias por sacar un rato para nosotros con esa pila de pacientes que te esperaban ansiosos...vaya cara nos ponían cuando nos colábamos en tu despacho... Fernando, gracias por tu generosidad y tu forma de manejar el laboratorio, has conseguido que ir a trabajar no sea duro porque es como estar en familia. Carlos, has estado al pie del cañón todo el tiempo y has sido un maestro Jedi digno de mencionar. Ha sido un placer ser tu Padawan, aunque a veces hayamos tenido que compartirtte con el resto de los becarios de la fundación, deseosos de que les guiaras con tus conocimientos sobre "la Fuerza", o mejor dicho: el FPLC, proteínas, geles o lo que fuera. Gracias también por respirar hondo y no pegarme cuatro gritos cuando me ponía pesada...

A Maru, por ser una buena amiga, porque revuelve el labo cuando aparece y por todo lo que nos reímos con ella. Pero sobre todo, muchísimas gracias por estar siempre ahí y por haberme ayudado tanto: gracias por tus charlas de subir el ánimo, por abrirme tu labo y por cuidarnos tanto. Muchííísimas gracias a ti, y de nuevo a Fernando, por solucionarlo todo cuando la cosa se puso fea con la financiación, las dos veces...

¡Gracias a todo mi labo! A Marina, la mejor compañera que se puede tener, gracias por acompañarme en un laboratorio lleno de arterias, sangre, pises y esas cosas... ¡Ánimo que ya no queda nada! A Aroa, indispensable, que siempre

está dispuesta a ayudarnos a todos aunque la tenga millones de cosas que hacer y sin la que todo esto habría sido mucho más difícil ("Gracias. Sí, sí hay por qué."). A Fer, que se esmera en amenizar el labo con música y bromas y se maneja estupendamente en un ambiente donde a la mínima distracción la conversación pasa a cosas "de chicas" ¡Venga, que eres el próximo! A Gloria, siempre optimista y con buen humor y que siempre tiene un rato para ayudarme cuando la incordio, pero ¡cómo pasa el tiempo! ¡Si ya llevas dos años en el labo!! Como me alegra que se dieran esas coincidencias que te hicieron acabar con nosotros... y por último, y sólo por orden de aparición, a Irene, que lleva menos tiempo con nosotros, pero que es una nueva genial y muy divertida a la que se le coge cariño desde el primer día, pero... por favor, no pongas tantas canciones tristes seguidas!

¡Muchas gracias chicos, por hacer posible un laboratorio siempre con comida para picar entre horas!

También han sido claves, en lo personal y laboral, los compañeros del labo de metabolismo mineral y óseo: empezando por los que están (Dani, Luis, Sergio, Ana y Marta) y sin olvidar a los que pasaron (David, Vero, Juanan, Irene y Raúl) por esos buenos ratos de desayunos y comidas y también por los que hemos pasado fuera del laboratorio.

Al resto de los integrantes de la mesa del comedor: Juan, aunque no siempre consigue aguantarse hasta una hora decente para comer, pero que de vez en cuando nos instruye con artículos científicos diferentes; a Pía, dispuesta en cualquier momento a dar guerra por los becarios; a las nuevas adquisiciones Raúl y Noelia, "a la UVI con vosotros", qué pena que no hayamos coincidido durante más tiempo!

Gracias también a todo el departamento de inmuno. Al mogollón de gente de Egidio: Bea (gracias también por tu insistencia en que empezara a escribir pronto), Vir, Alberto, Avo (gracias a él se sabe en qué página está el índice y

todo lo demás), Conchi, Sara, Belén, que aunque piden más que hablan molan bastante... y también se dejan pedir.

No me quiero olvidar de mi labo de Toledo: gracias a Tati, Ana, Félix, Sergio, Carmen y Carlos, me habéis ayudado mucho en esta última etapa.

Gracias a mis amigos, que pesada puedo llegar a ser: Guillermo, a quien siempre le apetece un rato de charla constructiva o destructiva; Paloma, el alma de la fiesta; Bernardo, incombustible e imprescindible; Bea, una tía genial; Jon, por tu buen humor y por estar dispuesto siempre a cualquier plan. Gracias a todos también por los consejos sobre ciencia, que suerte tener un equipo así en casa. También gracias a Ana, Usune, Sergio y Dani, por los buenos ratos de las escapadas de fin de semana que hacen desconectar a cualquiera. También, que no se me olvidan, a mis amigo del cole, gracias por todos estos años, un besazo muy gordo, que os llegue a Madrid, América, Taiwan, etc.

Pasando a la familia, gracias a la mía y a la de David. En especial, a mi madre, a José Luis, a mi hermano Gonzalo y a María, porque me han apoyado siempre y además han aguantado mis rollos y porque sí, porque son la familia que no se elige y he tenido más suerte que nadie. Gracias Gon por la ayuda artística, yo no hubiera sido capaz. Y de los que se eligen, a David, no me voy a poner ñoña, porque simplemente eres el mejor... ¡pero si hasta te has leído la tesis!

Por último, gracias papá por haberme inculcado un poco de tus ganas de saber, me hubiera encantado poder estar contigo y que me ayudaras con esto como hacías con todo.

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
APC:	Célula presentadora de antígeno.
ARN:	Ácido ribonucleico.
BSA:	Albúmina de Suero Bovino.
CDR:	Component Resolved Diagnosis.
DEPC:	Dietilpirocarbonato.
ConA:	Concanavalina A.
CRIT:	Component Resolved Immunotherapy.
DO:	Densidad Óptica.
DTT:	Ditiotreitol.
EAACI:	Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica.
ECL:	Sistema de detección por Quimioluminiscencia.
ELISA:	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzima.
Fab:	Fragmento del anticuerpo de unión al anticuerpo.
FBS:	Suero bovino fetal.
FCϵRI:	Receptor tipo I de alta afinidad.
IgE:	Inmunoglobulina E.
IgG:	Inmunoglobulina G.
IL:	Interleuquina.
IUIS:	Unión Internacional de sociedades de inmunología.
MALDI-TOF:	Espectrometría de masas de absorción ionización por láser asistida por matriz. Tiempo de vuelo.
MDH:	Malato Deshidrogenasa.
MHC-II:	Complejo Principal de Histocompatibilidad tipo II.
Motivos CpG:	Oligonucleótidos con secuencias inmunoestimuladoras.

MS:	Espectrometría de Masas.
MS/MS:	Espectrometría de Masas en Tandem.
nsLTP:	Proteínas Transportadoras de Lípidos no específicas.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
PAGE:	Poliacrilamida en Gel de Electroforesis.
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PVDF:	Difluoruro de polivinilideno.
RAST:	Test de Radioalergoadsorción.
TH:	Temperatura de Hibridación.
Rpm:	Revoluciones por minuto.
RT:	Retrotranscripción.
SAO:	Síndrome de Alergia Oral.
SDS:	Dodecilsulfato sódico.
SEM:	Desviación Estándar Media.
SIT:	Inmunoterapia Específica.
SPT:	Skin Prick Test.
SPPT:	Skin Prick Prick Test.
Tm:	Temperatura de fusión.
TPI:	Triosa Fosfato Isomerasa.
Triton X-100:	Octofenil etoxilato.
Tween-20:	Monoclorato de polioxietilsorbinato.
UV:	Ultravioleta.
WAO:	Organización mundial de alergia.

ÍNDICE

.

ÍNDICE	3
INTRODUCCIÓN	9
1. ALERGIA	11
1.1 Reacción alérgica	12
2. ALÉRGENOS Y NOMENCLATURA	15
3. ALERGIA A ALIMENTOS.....	17
3.1 Alergia a alimentos de origen vegetal. Alérgenos vegetales	21
4. REACTIVIDAD CRUZADA.....	26
5. DIAGNÓSTICO DE ALERGIA A ALIMENTOS.....	27
6. TRATAMIENTO	30
6.1 Aplicaciones de los alérgenos recombinantes.....	32
7. CUCURBITÁCEAS Y SANDÍA	34
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS.....	43
1. Soluciones y tampones:.....	43
2. Producción de los extractos alérgicos	46
3. Valoración de proteínas	47
4. Purificación de proteínas alérgicas	47
5. Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	49
6. Visualización de proteínas en SDS-PAGE.....	49
7. Transferencia electroforética	50
8. Identificación de proteínas:.....	50
9. Detección de glicoproteínas: Tinción con Concanavalina A.....	52
10. Sensibilidad a Pepsina	52
11. Determinación de parámetros moleculares.....	53
CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA	54
1. Caracterización de pacientes	54
2. Preparación de sueros.....	55
3. Anticuerpos utilizados y producción de anticuerpos policlonales	56
4. Inmunodetección y ensayos de inhibición.....	57
5. Enzaimunoensayo (ELISA) indirecto	58
6. ELISA de inhibición	59
7. Análisis estadístico	59
CLONACIÓN DE PROTEÍNAS ALERGÉNICAS	60
1. Electroforesis de ácidos nucleicos	60

2. Extracción de ARN.....	60
3. Producción de cADN: RT PCR	61
4. Técnicas de amplificación de secuencias: PCR	62
5. Aislamiento de ADN plasmídico.....	62
6. Enzimas de restricción.....	63
7. Ligación.....	63
8. Técnicas de clonación	63
9. Secuenciación de ADN.....	66
10. Microorganismos	66
11. Vectores plasmídicos de clonación	68
12. Vectores plasmídicos de expresión	68
13. Transformación de células de <i>E. coli</i>	69
14. Almacenamiento de cultivos bacterianos y de levaduras: Stock de glicerol	71
PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	72
1. Expresión en <i>Pichia pastoris</i>	72
2. expresión en <i>Baculovirus</i>	74
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ALÉRGENOS PURIFICADOS (NATURALES Y RECOMBINANTES)	79
1. Activación de basófilos.....	79
RESULTADOS	81
CARACTERIZACIÓN DE LOS PACIENTES	83
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS.....	85
1. Identificación de las proteínas alergénicas de sandía.....	85
2. Identificación y caracterización de las proteínas alergénicas: secuenciación de Edman y Espectrometría de Masas	87
3. Purificación de proteínas alergénicas	89
4. Susceptibilidad de los alérgenos de sandía a la pepsina.....	98
5. Purificación de profilina con Sepharose poly-prolina	99
CLONAJE Y SECUENCIACIÓN DEL CADN CODIFICANTE DE RPROFILINA.....	102
1. Purificación de profilina recombinante	103
2. Detección de profilina recombinante.....	104
SIMILITUD ENTRE PROFILINAS	105
1. Equivalencia inmunológica de rProfilina y nProfilina.....	107
Pruebas de activación de basófilos (Basotest).....	111
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS MOLECULARES DE LA PROFILINA A PARTIR DE PREDICCIONES TEÓRICAS.....	112
CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL CADN CODIFICANTE DE RMDH	117
1. Expresión de rMDH en <i>Pichia pastoris</i>	117
2. Expresión de rMDH en <i>Baculovirus</i>	119
EQUIVALENCIA INMUNOLÓGICA DE RMDH Y NMDH.....	121

1. Reconocimiento de rMDH y nMDH por la IgG del antisuero de conejo	121
2. Reconocimiento de rMDH y nMDH por las IgEs de los sueros de los pacientes	123
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS MOLECULARES DE LA MDH A PARTIR DE PREDICCIONES TEÓRICAS	124
DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS: TINCIÓN CON CONCAVALINA A.....	128
DISCUSIÓN	129
1. ALERGIA A ALIMENTOS.....	131
2. PACIENTES	132
3. ANTICUERPOS POLICLONALES	135
4. ALÉRGENOS DE SANDÍA.....	136
4.1. Identificación de alérgenos	137
4.2. Profilina.....	138
4.3. Malato deshidrogenasa (MDH).....	146
5. PERSPECTIVAS.....	149
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXOS	171

INTRODUCCIÓN.

1. Alergia

La reacción alérgica se puede definir como una respuesta anormal del sistema inmune a una sustancia ajena al organismo y normalmente inocua, denominada alérgeno.

El término alergia fue introducido en la literatura médica en 1906 por Von Pirquet para referirse a una respuesta inmunológica nociva. En 1921, Prausnitz y Küstner ⁽¹⁾, demostraron la implicación de al menos tres componentes: un alérgeno, que desencadenaba la respuesta inmunológica, la Inmunoglobulina E (IgE) y un componente celular, los mastocitos. Más tarde, Pepys ⁽²⁾ definió la atopia como aquella forma de reactividad inmunológica en el individuo, en la que se producen anticuerpos IgE en respuesta a la exposición a alérgenos comunes del ambiente del individuo. La IgE, el anticuerpo producido ante la exposición al alérgeno, fue descrita por primera vez en 1968 ⁽³⁾ y aunque es la inmunoglobulina menos abundante en el suero (aproximadamente 75 ng/ml frente a los 100 mg/ml de la IgG, inmunoglobulina responsable de la respuesta inmune adaptativa), aumenta enormemente con la exposición al antígeno y es capaz de provocar potentes respuestas del sistema inmune.

En 1963, Gell y Coombs realizaron una clasificación de las reacciones de hipersensibilidad, estableciendo cuatro tipos: hipersensibilidad tipo I o anafiláctica, tipo II o citotóxica, tipo III o reacción de Arthus (daño por complejos antígeno-anticuerpo) y tipo IV o de hipersensibilidad retardada (mediada por células) ⁽⁴⁾.

Finalmente, y con el fin de unificar conceptos previos, la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica (EAACI) publicó en el año 2001 una revisión de la nomenclatura en alergología ⁽⁵⁾, posteriormente revisada en el 2003 por la Organización Mundial de Alergia (WAO) ⁽⁶⁾. En la misma, se establece el término **hipersensibilidad** para describir síntomas, o signos objetivos y reproducibles, iniciados por la exposición a estímulos definidos a una dosis

tolerada por personas sanas, mientras que **alergia** se refiere aquella reacción de hipersensibilidad iniciada por mecanismos inmunológicos específicos, que puede ser mediada por anticuerpos o por células. Cuando el anticuerpo pertenece al isotipo IgE, se habla de **alergia mediada por IgE**.

Por último, según la EAACI, el término **atopia** ha de referirse a la predisposición genética de un individuo para producir anticuerpos IgE en respuesta a sustancias toleradas por la mayoría de la población expuesta.

1.1 Reacción alérgica

La alergia tipo I, o hipersensibilidad inmediata, es una anomalía clínica cuya incidencia ha aumentado de forma notable en los últimos años, llegando a afectar al 25% de la población de los países desarrollados (7). Se caracteriza por la liberación de mediadores desencadenada por la reacción antígeno-anticuerpo. Estos mediadores son los responsables de los efectos de las reacciones anafilácticas.

La respuesta alérgica (figura 1) es un proceso complejo cuyos mecanismos no se conocen en su totalidad. Este proceso consta de dos etapas diferenciadas: la primera de **sensibilización y memoria** y la segunda de **provocación**.

Durante la primera fase, los linfocitos B liberan IgEs en respuesta a una primera exposición al alérgeno. Las moléculas alérgicas o alérgenos penetran en el organismo a través de las mucosas o la piel, y son captadas y transportadas hasta las estructuras linfáticas por las células presentadoras de antígeno (APC) como células dendríticas, células M y macrófagos. En los individuos alérgicos, estas células se acumulan abundantemente en las mucosas, en los ganglios linfáticos y donde exista una elevada concentración de antígenos. Otra función de las APC es el procesamiento del alérgeno en pequeños fragmentos peptídicos que serán expuestos en su superficie asociados al complejo principal de

histocompatibilidad de clase II (MHC-II o HLA-II en humanos) ⁽⁸⁾, donde serán presentados a los linfocitos T CD4⁺ induciendo su activación y su diferenciación a células colaboradoras de tipo 2 o células Th2. Estas células secretan, entre otras interleuquinas, IL-4 e IL-13, que contribuyen a la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de IgE en la respuesta dependiente de linfocitos T. Simultáneamente, tiene lugar la interacción física entre células T y B, en la que participan diferentes moléculas de adhesión de la superficie celular, y que es esencial en este proceso. Por otro lado, las células B circulantes son capaces de reconocer el antígeno gracias a los receptores que poseen en su membrana (Ig) resultando así activados (respuesta independiente de linfocitos T). Parte de las IgE producidas por las células plasmáticas se unen a receptores de alta afinidad (Fc ϵ RI) de mastocitos, y otras entran en circulación y se unen a Fc ϵ RI de basófilos circulantes y mastocitos presentes en otros tejidos. Tras la sensibilización, un remanente de células T y B de memoria sobreviven y pueden responder ante nuevos contactos con el alérgeno.

La activación de mastocitos y basófilos como consecuencia de una nueva exposición al alérgeno constituye la segunda etapa o etapa de **provocación**, que a su vez consta de dos fases: reacción inmediata y reacción tardía.

En la reacción inmediata el alérgeno se une a las regiones Fab de las IgE. Este inmunocomplejo se une a través de los receptores Fc ϵ a la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos), lo que conduce a la degranulación de estas células y consecuentemente la liberación brusca y masiva de los mediadores preformados en la célula o mediadores primarios, responsables de la reacción alérgica temprana o inmediata, entre los que destaca la histamina, sustrato de los fármacos antihistamínicos empleados en el tratamiento de la alergia.

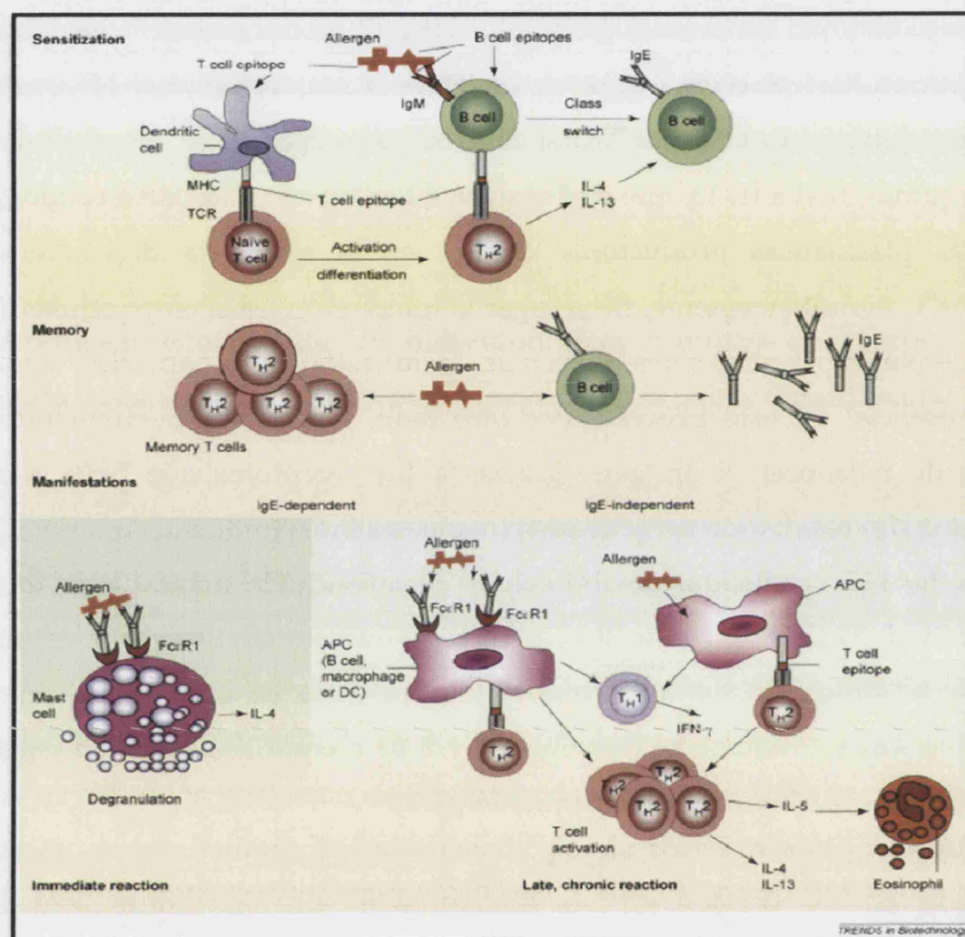


Figura 1: Representación de la reacción alérgica. Figura tomada de Bhalla ⁽⁹⁾.

Una fosfolipasa A activada durante el proceso actúa sobre los fosfolípidos de la membrana liberándose ácido araquidónico, sustrato para los sistemas enzimáticos de la cicloxigenasa y de la lipoxigenasa, que darán lugar a prostaglandinas y tromboxanos, la primera y leucotrienos, la segunda.

Estos mediadores actúan sobre distintos tejidos provocando la sintomatología típica de la alergia, que puede variar desde el picor temporal hasta la muerte súbita por shock anafiláctico, pasando por otros síntomas comunes como la rinitis, el asma bronquial, la conjuntivitis, urticaria, eczemas, dermatitis atópica y trastornos gastrointestinales.

Si existiera una reexposición al alérgeno prolongada, el individuo alérgico podría llegar a experimentar una reacción tardía. Esta reacción está provocada

por la acumulación de eosinófilos y otras células inflamatorias atraídas hacia la zona de la reacción alérgica por factores quimiotácticos tales como la interleuquina IL-5, liberada junto con otras citoquinas proinflamatorias (IL-13, IL-4) por células T específicas de memoria, las cuales se activan y proliferan al ser presentado el alérgeno. A este proceso se le considera el principal responsable de la **hiperreactividad inespecífica**. Dicha hiperreactividad se traduce en la aparición de síntomas frente a numerosos irritantes tales como el frío, los contaminantes, el tabaco, así como en la persistencia de dichos síntomas de forma crónica, más allá de la exposición del alérgeno. En los casos más severos, esta reacción puede ocasionar la muerte del individuo por obstrucción de las vías respiratorias y colapso cardiovascular (shock anafiláctico).

2. Alérgenos y nomenclatura

Son alérgenos aquellas moléculas capaces de provocar reacciones alérgicas mediadas por IgE. La mayoría de los alérgenos son proteínas, incluyendo glico- y lipoproteínas. Existe gran controversia en cuanto a la capacidad alergénica de los carbohidratos. Para que una molécula se comporte como un alérgeno es necesario que se cumplan determinadas características, como por ejemplo la estabilidad estructural, pero también son importantes la dosis y la ruta de exposición de dicho alérgeno. De hecho, algunos estudios afirman que cualquier proteína que entra en contacto con el sistema inmune de un individuo atópico en suficiente cantidad y en el contexto adecuado puede provocar la activación del sistema inmune ⁽¹⁰⁾. Sin embargo, según Radauer et al., no cualquier proteína puede convertirse en alérgeno, basándose en que existen relativamente pocas familias de proteínas en las que se encuentran alérgenos y que entre ellos se repiten determinadas funciones biológicas una y otra vez ^{(11) (12)}.

Hoy por hoy, aún no se conocen las causas de la alergenidad, pero se barajan varias hipótesis: el mimetismo con proteínas endógenas, que posean

propiedades surfactantes; la capacidad para unir ligandos o la hipótesis de la actividad biológica, según la cual la mayoría de los alérgenos son enzimas, inhibidores enzimáticos, proteínas reguladoras o de transporte.

Existen dos teorías acerca de la evolución de las proteínas alérgicas ⁽¹¹⁾. Según la primera, la alergenidad ha sido una capacidad intrínseca de las moléculas ancestrales de determinadas familias de proteínas y se ha distribuido entre las proteínas actuales mediante métodos evolutivos. En la segunda teoría la alergenidad aparecería mucho después, también debido a características estructurales, pero dada aleatoriamente en determinadas proteínas.

Generalmente, los alérgenos son moléculas pequeñas, con una masa molecular entre 5 y 70 kDa, lo que les permite el paso a través de las mucosas, pero con tamaño suficiente como para activar la respuesta inmune ⁽¹³⁾.

Dentro de una determinada fuente alérgica existen alérgenos principales, que son aquellos que son reconocidos por más del 50% de los pacientes alérgicos a esa fuente, siendo los alérgenos menores los reconocidos por menos de dicho porcentaje de pacientes ⁽¹⁴⁾.

La zona de los alérgenos que es reconocida por las IgEs son los determinantes antigénicos o epítomos. Están formados por un número variable de aminoácidos, y pueden ser secuenciales (continuos) o conformacionales (discontinuos). Los epítomos secuenciales, como su nombre indica, están formados por la secuencia lineal de los aminoácidos presentes en la estructura primaria de la proteína, mientras que en los epítomos conformacionales participa la estructura tridimensional del alérgeno, por lo que un epítomo conformacional puede estar formado por aminoácidos muy distantes, pero que se encuentran próximos una vez que la proteína se ha plegado ⁽¹⁵⁾.

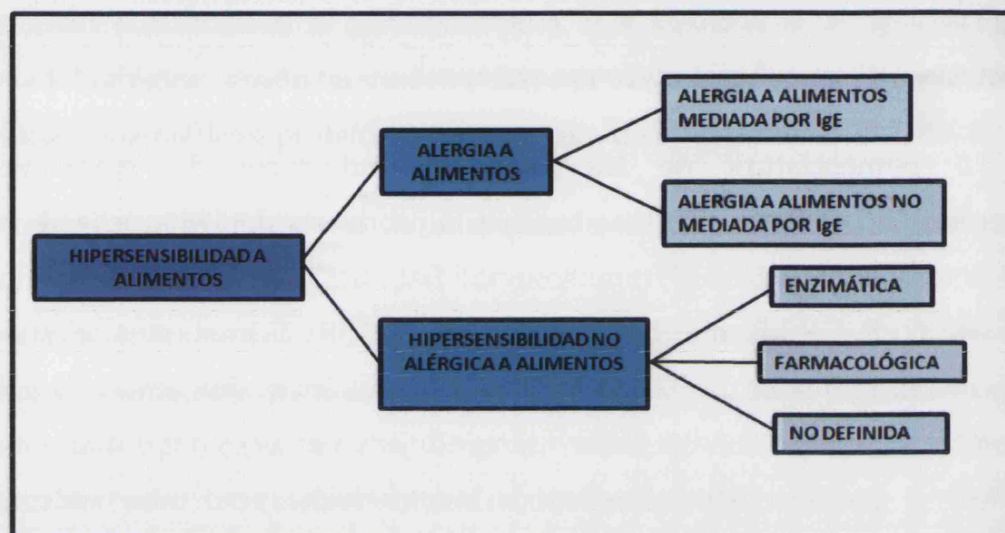
La caracterización de alérgenos comprende la determinación de la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional, las modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilaciones, que pueden tener gran influencia en la

alergenicidad, la estabilidad a la temperatura y la resistencia a las enzimas digestivas, así como el mapeo de sus epítomos.

La nomenclatura de los alérgenos inductores de reacciones de hipersensibilidad de tipo I ⁽¹⁶⁾ se basa en la propuesta de 1986 realizada por la IUIS (International Union of Immunological Societies) y de la OMS (Organización Mundial de la Salud), que fue revisada en 1994 ⁽¹⁷⁾. Según estos criterios, los alérgenos se nombran utilizando las tres primeras letras del género, la primera letra de la especie (o las dos primeras, si indujera a error) y un número arábigo correlativo, que se refiere al orden de identificación, pero intentando que el mismo número se utilice para alérgenos homólogos (aunque no es un requisito indispensable). Así Cuc m 2 y Cit la 2 se refieren a las profilinas de melón (*Cucumis melo*) y sandía (*Citrullus lanatus*), por ejemplo.

3. Alergia a alimentos

La alergia a alimentos se engloba dentro de las reacciones de hipersensibilidad a alimentos en las que participa el sistema inmune. Será una reacción no alérgica aquella en la que el alimento provoca una reacción adversa sin implicación alguna del sistema inmune del individuo, causada por defectos enzimáticos del paciente, por acción de fármacos añadidos o naturales de la fuente alimenticia o por otras causas no definidas. Cuando existe mediación por IgEs, se trata de una reacción de hipersensibilidad de tipo I (Esquema 1).



Esquema 1: Clasificación de las reacciones de hipersensibilidad alimentaria.

Dentro de las reacciones alérgicas a alimentos, las que tienen mayor relevancia son aquellas mediadas por IgE, en la que la presencia de anticuerpos de este tipo está confirmada por la historia clínica del paciente, pruebas *in vivo* e *in vitro*, así como pruebas de provocación.

En Estados Unidos, la alergia a alimentos afecta en su mayoría a niños, aproximadamente al 6% de ellos, de los que la mayoría son menores de tres años ⁽¹⁸⁾. Los síntomas desaparecen antes de cumplir los 5 años en un 80% de los casos ⁽¹⁹⁾, aunque algunos de ellos adquieren nuevas alergias ⁽¹⁸⁾. Este tipo de alergia parece ser menos común en la población adulta, ya que sólo afecta a un 2% de la población en general ⁽¹⁹⁾.

En España, según el estudio epidemiológico Alergológica ⁽²⁰⁾, la alergia a alimentos ocupa el quinto puesto como motivo de consulta en los servicios de Alergología, detrás de rinitis y conjuntivitis, asma bronquial y alergia a medicamentos. Por otro lado, se ha observado un incremento de la prevalencia de la alergia a alimentos, que en el intervalo comprendido entre 1992 y 2005 pasó de un 4% a un 7.4% ⁽²⁰⁾.

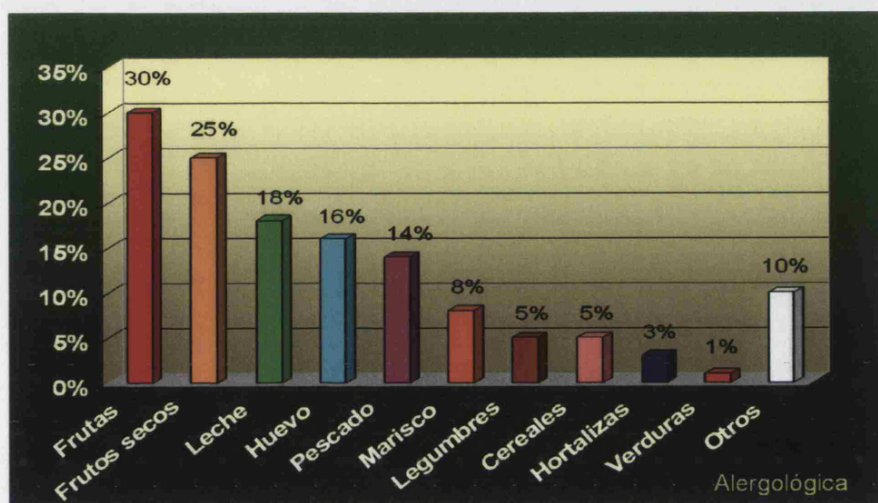


Figura 2. Relación de alimentos que causan alergia. Figura tomada del estudio Alergológica ⁽²⁰⁾. Se representa en el eje de la Y el porcentaje de los pacientes afectados y en de la X los alimentos causantes de la reacción.

A pesar de que son muchos los alimentos susceptibles de causar alergia, son relativamente pocos los que provocan la mayoría de los casos y se pueden agrupar en: leche, huevo, frutos secos, frutas, pescado y marisco (figura 2). En niños estadounidenses, la leche de vaca, cacahuete, soja, trigo y pescado comprenden el 85% de los casos de alergia a alimentos documentadas, mientras que entre la población adulta, los frutos secos, pescado y marisco son los responsables de la mayoría de los casos descritos ⁽¹⁹⁾. En España se ha descrito la alergia a frutas como la causa más frecuente de alergia alimentaria en adultos ⁽²⁰⁾, afectando al 30% de los pacientes que sufren alergia a alimentos (figura 3).

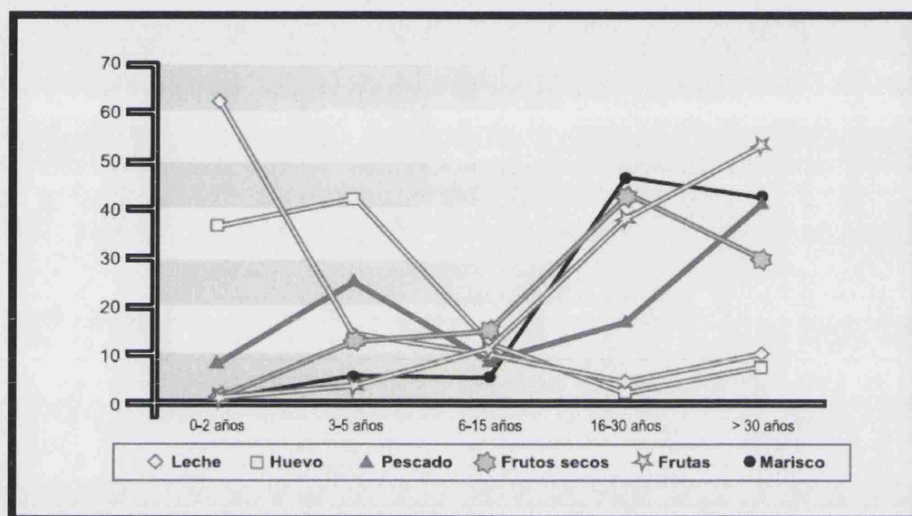


Figura 3. Relación de alimentos que causan alergia por grupos de edad. Figura tomada del estudio Alergológica ⁽²⁰⁾. Se representa en el eje de la Y el porcentaje de los pacientes afectados y en de la X los grupos de edad de los pacientes.

La alergia a alimentos se ha clasificado en dos tipos: **clase I**, en la que la sensibilización a los antígenos alimentarios ocurre por vía gastrointestinal, y **clase II**, en la que la sensibilización a un aeroalérgeno ocurre por vías respiratorias y la reactividad cruzada con el alimento provoca los síntomas tras su ingestión ⁽²¹⁾. Los alérgenos de clase I son en su mayoría proteínas o glicoproteínas hidrosolubles con masas moleculares entre 10 y 70 kDa, que suelen ser estables a los tratamientos con calor, ácidos y proteasas, mientras que los alérgenos de clase II son normalmente proteínas de origen vegetal, lábiles y difíciles de purificar, lo cual limita en gran medida la obtención de extractos estandarizados para fines diagnósticos ⁽¹⁹⁾.

3.1 Alergia a alimentos de origen vegetal. Alérgenos vegetales

Hoy en día se acepta que la alergia a frutas y vegetales pueda ser el resultado de una primera sensibilización a pólenes o látex ⁽²²⁾ que derivaría después a alergia alimentaria por reactividad cruzada, aunque no todos los casos de alergia alimentaria se deben a casos de reacción cruzada con proteínas de polen.

Los alérgenos implicados en la reactividad cruzada son proteínas muy conservadas y ubicuas, es decir, están ampliamente distribuidos y se encuentran en una gran variedad de fuentes.

Los alérgenos de origen vegetal se pueden clasificar en familias y superfamilias en base a sus propiedades estructurales y funcionales ⁽²³⁾. La mayoría (60%) de los alérgenos vegetales de alimentos pueden agruparse en tan solo cuatro familias: Prolaminas, cupinas, profilinas y proteínas homólogas al alérgeno principal de abedul, Bet v1 ⁽¹¹⁾ (tabla 1).

1) Prolaminas:

Deben su nombre a la gran cantidad de prolina y glutamina que contienen.

Se trata de la superfamilia que mayor número de alérgenos contiene. Son proteínas con gran similitud en su estructura tridimensional y muy ricas en estructuras de α -hélice, a pesar de que la similitud de secuencia sea muy escasa.

Forman parte de esta familia las prolaminas de cereales, albúminas 2S, inhibidores de α -amilasa y de tripsina y proteínas transportadoras de lípidos no específicas (ns LTP) ⁽²⁴⁾.

- Proteínas Transportadoras de Lípidos no específicas (ns LTP):

Las LTPs constituyen, además, la familia 14 de las proteínas protectoras (PR-14) ⁽²⁵⁾. Estas proteínas son sintetizadas por las plantas para evitar los efectos de microorganismos patógenos y de condiciones meteorológicas adversas.

Las LTPs son proteínas monoméricas de 7-9 kDa, que contienen cuatro puentes disulfuro que forman un túnel hidrofóbico ⁽²⁶⁾. Se trata de proteínas con una amplia distribución en el mundo vegetal, que se suelen acumular en las capas externas de los órganos vegetales ⁽²⁷⁾, lo cual explica que algunos pacientes toleren los alimentos pelados. Son altamente resistentes a la temperatura, proteólisis y cambios de pH ⁽²⁷⁾, asociándose con síntomas sistémicos en los pacientes afectados.

Encontramos LTPs como alérgenos principales en gran cantidad de fuentes de origen vegetal, sobre todo en la región mediterránea, donde son los alérgenos más importantes de la familia de las rosáceas, como en el melocotón, en la manzana, y el albaricoque: Pru p 3⁽²⁸⁾, Mal d 3 ⁽²⁹⁾, Pru ar 3⁽³⁰⁾, respectivamente.

- Proteínas de almacenamiento:

Son proteínas que se encuentran fundamentalmente en las semillas y que ayudan en los procesos de germinación ⁽³¹⁾. Además, ayudan a la planta a sobrevivir en condiciones adversas. Dentro de esta familia encontramos a las albúminas.

Las albúminas 2S son proteínas típicas de plantas dicotiledóneas, heterodiméricas con dos cadenas polipeptídicas de 4 a 9 kDa, unidas por cuatro puentes disulfuro. No están glicosiladas, pero sí sufren determinadas modificaciones post-traduccionales para dar lugar a la proteína madura. Dentro del grupo formado por las albúminas 2S encontramos varios de los alérgenos presentes en frutos secos y semillas ⁽²³⁾.

2) Cupinas:

Son proteínas con funciones muy diversas, cuya evolución se puede seguir desde las arqueas y bacterias hasta los eucariotas, incluyendo plantas y animales ⁽¹³⁾. Tienen una estructura común de 6 barriles beta-laminares ⁽³²⁾. Los subgrupos de las cupinas se clasifican según tengan un único dominio cupina o una estructura multicupina. Dentro de esta superfamilia, se estima que existan aproximadamente 18 subclases funcionales ⁽³³⁾.

Dentro de la familia de las cupinas se encuentran las globulinas: se pueden distinguir las 11S, también llamadas leguminas, y las 7S o vicilinas, nombradas así por las diferencias encontradas en sus coeficientes de sedimentación ⁽²³⁾.

Las leguminas son proteínas hexaméricas de 360 kDa; cada subunidad tiene dos cadenas unidas por un puente disulfuro: un polipéptido denominado cadena básica o beta, de 20 kDa y una cadena ácida o alfa, de 30-40 kDa.

Las vicilinas son proteínas triméricas de 150-190 kDa ⁽²³⁾, que no están unidas por puentes disulfuro debido a que no contienen cisteínas ⁽³¹⁾. Las vicilinas sufren proteólisis y glicosilaciones como modificaciones post-traduccionales, lo cual afecta a su tamaño final.

3) Homólogos a Bet v1:

El alérgeno principal del polen de abedul, Bet v1, forma parte de la familia 10 de las proteínas protectoras (PR-10) ⁽³⁴⁾ y está ampliamente distribuido entre las plantas dicotiledóneas ⁽³⁵⁾, pero también está presente en las monocotiledóneas ⁽³⁶⁾ y gimnospermas ⁽³⁷⁾.

Estudios de comparación de las secuencias de proteínas revelaron que la superfamilia de Bet v1 está formada al menos por cuatro familias con poca identidad de secuencia entre ellas: la familia de las PR-10, la familia de las proteínas principales del látex y las proteínas relacionadas con la maduración, las norclaurin sintasas y las proteínas de unión a citoquininas de legumbres ⁽¹¹⁾.

4) Profilinas:

Son proteínas citoplásmicas monoméricas con una masa molecular que puede oscilar entre 12 y 15 kDa, con capacidad de unir monómeros de actina, por lo que tienen una importante función reguladora en la polimerización del citoesqueleto ⁽³⁸⁾.

En el modelo de plantas *Arabidopsis thaliana* se ha observado que los 8-10 genes observados para la profilina ⁽³⁹⁾ se pueden agrupar en dos grupos: uno que se expresa en los tejidos somáticos y otro que exclusivamente se expresa en el desarrollo del polen, es decir, existen dos isoformas de profilina, la constitutiva y la polínica ⁽³⁹⁾ ⁽⁴⁰⁾.

La profilina fue descrita por primera vez por Valenta en el año 1991, en el polen de abedul, denominada Bet v2 ⁽⁴¹⁾. A partir de ahí han sido descritas en numerosas fuentes vegetales (www.allergome.org) y se ha observado que entre las diferentes profilinas existe una elevada similitud tanto de secuencia como de estructura terciaria ⁽⁴²⁾, plegándose en estructura globular con alfa-hélices y láminas beta.

Las profilinas se asocian con los síntomas típicos del síndrome de alergia oral (SAO), produciendo síntomas leves, confinados casi exclusivamente a la región orofaríngea. Esto se debe a la naturaleza lábil de la profilina, que pierde su capacidad de unir IgE al entrar en contacto con los fluidos gástricos, pero no con la saliva ⁽⁴³⁾ ⁽⁴⁴⁾ ⁽⁴⁵⁾.

Las profilinas son proteínas implicadas en casos de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos.

FAMILIA		ALÉRGENO	FUENTE ALERGÉNICA
PROLAMINAS	LTPs (PR-10)	Ara h 9, Art v 3, Bra o 3, Cas s 8, Cor a 8, Lac s 1, Mal d 3, Pla a 3, Pru ar 3, Pru av 3, Pru d 3, Pru p 3, Ole e 9, Hev b 12, Gly m 1.	Cacahuete, artemisia, col, castaña, avellana, lechuga, manzana, plátano de sombra, albaricoque, cereza, ciruela, melocotón, olivo, látex, soja.
	Albúminas 2S	Ana o 3, Ara h 2 y Ara h 6, Ber e 1, Bra j 1, Bra n 1, Bra r 1, Car i 1, Jug ca 1, Jug ci 1, Jug n 1, Jug r 1, Sis i 1 y Ses i 2, Sin a 1.	Anacardo, cacahuete, nuez de Brasil, mostaza oriental, colza, nabo, nuez americana, nogal de california, nogal ceniciento, nogal negro, nogal europeo, sésamo, mostaza.
CUPINAS	Globulinas 11 S (Leguminas)	Ana o 2, Ara h 3 y ara h 4, Ber e 2, Cor a 9, Ric c 2, Ses i 6, Sin a 2.	Anacardo, cacahuete, nuez de Brasil, avellana, ricino, sésamo, mostaza.
	Globulinas 7 S (Vicilinas)	Ana o 1, Ara h 1, Cor a 11, Jug r 2, Len c 1, Pis s 1, Ses i 3.	Anacardo, cacahuete, avellana, nuez, lenteja, guisante, sésamo.
Bet v 1 y Homólogos de Bet v 1 (PR-10)		Bet v 1, Aln g 1, Api g 1, Mal d 1, Pru ar 1, Cas s 1, Pru v 1, Pru p 1, Pyr c 1, Dau c 1.	Abedul, aliso, apio, manzana, albaricoque, castaña, cereza, melocotón, patata, zanahoria.
PROFILINAS		Act d 9, Ara h 5, Art v 4, Bet v 2, Che a 2, Cor a 2, Cuc m 2, Gly m 3, Lyc e 1, Mal d 4, Pru av 4, Pru p 4, Pyr c 4.	Kiwi, cacahuete, artemisia, abedul, cenizo, avellana, melón, soja, tomate, manzana, cereza, melocotón, pera.

Tabla 1: Clasificación de las familias de los alérgenos vegetales con algunos ejemplos.

4. Reactividad cruzada

En el proceso de reactividad cruzada primero se produce una sensibilización a un alérgeno, el cual induce la síntesis de IgE específica. Estas IgEs pueden posteriormente reconocer epítomos presentes en proteínas homólogas procedentes de otras fuentes. Estas proteínas comparten similitud estructural y poseen epítomos comunes.

Cuando estas proteínas son ubicuas en la naturaleza, están presentes en fuentes alérgicas no relacionadas taxonómicamente y presentan reactividad cruzada se denominan panalérgenos.

La reactividad cruzada es un concepto inmunológico y no clínico, ya que aunque en algunos casos ocurre, en sentido estricto no necesariamente se traduce en síntomas clínicos. Es decir, un paciente puede estar sensibilizado a dos o a más fuentes alérgicas debido a reactividad cruzada, pero no es necesario que presente síntomas a todas ellas.

Los principales panalérgenos implicadas en los procesos de reactividad cruzada en alergias a pólenes y frutas son:

1. Profilinas: Las profilinas son alérgenos de origen vegetal implicados en multitud de casos de reactividad cruzada, como el síndrome látex-frutas ⁽⁴⁶⁾, la reactividad cruzada entre pólenes ⁽⁴⁷⁾ y la existente entre pólenes-látex-frutas ⁽⁴⁸⁾, por lo que los pacientes sensibilizados a estas proteínas reaccionan a una amplia gama de fuentes vegetales ⁽⁴⁹⁾ ⁽⁵⁰⁾ ⁽³⁸⁾.

2. Bet v 1 y homólogos de Bet v 1: se trata de un grupo de alérgenos responsable de casos de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos entre miembros de la familia de las fagáceas, como el abedul, castaño o avellano, y miembros de las familias de las rosáceas (manzana, melocotón, albaricoque) y de las umbelíferas (apio, zanahoria) ⁽⁵¹⁾ ⁽⁵²⁾.

3. Familias relacionadas filogenéticamente: aunque no son panalérgenos propiamente dichos, ya que su homología reside en que se trata de proteínas procedentes de familias relacionadas filogenéticamente, son responsables de los casos de reactividad cruzada dentro de la familia de la que forman parte. Son ejemplos, Lig v 1 ⁽⁵³⁾, Syr v 1 ⁽⁵⁴⁾ y Fra e 1 ⁽⁵⁵⁾, dentro de las oleáceas o las LTPs de rosáceas y frutos secos, como el cacahuete y la nuez ⁽⁵⁶⁾.

4. Carbohidratos: debido a la escasa diversidad estructural de estas moléculas, los azúcares pueden ser los responsables de determinados casos de reactividad cruzada. Se ha observado que las glicoproteínas parecen tener un importante papel en la sensibilización, lo cual podría deberse a la menor variabilidad de éstos frente a la de las proteínas, permitiendo explicar la aparición de fenómenos de reactividad cruzada entre especies que no son cercanas filogenéticamente ni tienen similitud estructural o funcional. Generalmente se trata de oligosacáridos con residuos de fucosa y xilosa unidos a la cadena peptídica por enlace N-glicosídico ⁽⁵⁷⁾.

5. Diagnóstico de alergia a alimentos

El diagnóstico de la alergia a alimentos comienza con la historia clínica del paciente y demuestra la existencia de una reacción adversa a un alimento. Seguidamente ha de confirmarse la existencia de un mecanismo de hipersensibilidad inmediata mediada por IgE. Para esto se utilizan diferentes métodos, como las pruebas cutáneas, que son de lectura inmediata, como el Skin Prick Test (SPT) realizado con extractos comerciales o el Prick-Prick Test (SPPT), a partir de frutas frescas. Además el diagnóstico clínico se complementa con la cuantificación de la IgE sérica total o de la IgE específica.

La cuantificación de la IgE total permite diferenciar a los atópicos de los no atópicos. Esta diferencia presenta ciertas limitaciones, ya que hay que tener en cuenta las variaciones de esta inmunoglobulina según la época del año o la

inmunoterapia. Igualmente las variaciones en los niveles de plasma de los valores de IgE en la población normal, pueden provocar un solapamiento entre los no atópicos y los atópicos. Debido a esto puede resultar de mayor utilidad la determinación de la IgE específica frente a determinados alimentos, utilizando las técnicas de RAST (radioalergoadsorción) o CAP. Esta última es una técnica enzimofluorométrica que no presenta los inconvenientes del uso de anticuerpos marcados con radiactividad (¹²⁵I) que utiliza el RAST y lo supera en valores de sensibilidad y especificidad.

De todos modos, como ya se ha mencionado anteriormente, estas pruebas principalmente demuestran que existe un mecanismo subyacente mediado por IgE, pero no ha de ir necesariamente asociado a manifestaciones clínicas ⁽⁹⁾.

También son de gran utilidad diagnóstica las pruebas de provocación, que permiten comprobar si existe relación entre la ingestión y los síntomas, confirmando o eliminando la existencia de alergia alimentaria ⁽⁹⁾. Es importante comprobar que los alimentos sospechosos son realmente los que provocan los síntomas en el paciente antes de instaurar una dieta de eliminación, que podría llegar a ocasionar problemas para el paciente, debido a carencias alimenticias, económicas o sociales.

Entre las pruebas de provocación de alergia a alimentos encontramos tres tipos: la **provocación oral abierta**, en la que el alimento sospechoso de causar la alergia se administra por vía oral; la **prueba de provocación oral a simple ciego**, que consiste en administrar el alimento de manera encubierta por otra fórmula y, por último, la **prueba de provocación oral doble ciego controlada con placebo**, que es la más fiable y que abarca no solo el diagnóstico de alergia alimentaria, sino todas las reacciones adversas a alimentos ⁽⁵⁸⁾, donde se administran dosis del alimento sospechoso y de placebo en distintos momentos de la prueba y sin conocimiento del paciente ni del facultativo.

Hay que tener en cuenta la calidad de los extractos para el diagnóstico *in vivo* de la alergia a alimentos. Se pueden distinguir distintos tipos de extractos ⁽⁵⁹⁾:

- **Los extractos naturales parcialmente purificados:** se obtienen realizando un extracto del material alergénico a partir de la fuente alimenticia. Contienen gran cantidad de componentes, de los cuales no todos son los que han producido la sensibilización de los pacientes. Estos extractos se comercializan, pero presentan ciertos inconvenientes, como la falta de estandarización en su producción, debido a la variabilidad en factores como la selección del material, el método de extracción o el almacenamiento de los extractos.

- **Los alérgenos naturales purificados:** se obtienen aislando los alérgenos del extracto completo. La calidad de estos extractos depende del proceso de purificación y de su rentabilidad económica. La ventaja de la utilización de alérgenos purificados en el diagnóstico de alergias alimentarias radica en la disposición de un panel de proteínas alergénicas de un mismo alimento, gracias al cual se puede realizar un diagnóstico más exhaustivo. Sin embargo, existe un desconocimiento de la relevancia clínica de los alérgenos una vez purificados.

- **Los alérgenos recombinantes:** Permiten la producción estandarizada de alérgenos purificados de manera ilimitada y económica. Pero no siempre es fácil la clonación de un alérgeno, a lo que hay que añadir que los alérgenos recombinantes no poseen todas las isoformas existentes en la naturaleza y que es necesario validar la respuesta frente al alérgeno natural purificado, así como la relevancia clínica de la forma recombinante.

En los últimos tiempos la técnica de los microarrays ha permitido grandes avances en el campo del diagnóstico ⁽⁹⁾, no por dar mejores resultados que las técnicas clásicas, como el SPT, sino porque permiten probar un gran número de alérgenos en un solo ensayo ⁽⁶⁰⁾ ⁽⁶¹⁾ ⁽⁶²⁾. Además, los microarrays presentan otras ventajas, ya que requieren menores cantidades de proteína alergénica, así como de suero de paciente. Por otro lado cabe destacar que las condiciones del ensayo mimetizan las condiciones *in vivo* del paciente, donde los alérgenos se encuentran en cantidades mínimas y no están disponibles en exceso para captar IgE ⁽⁶³⁾.

La técnica de los microarrays además de utilizarse con fines diagnósticos, también sirve como herramienta en la identificación de las secuencias de unión a

IgE (epítomos) dentro de los alérgenos, como se ha llevado a cabo con éxito con alérgenos del cacahuete ⁽⁶⁴⁾, del trigo ⁽⁶⁵⁾ o de la caseína de leche de vaca ⁽⁶⁶⁾.

6. Tratamiento

Hasta la fecha la única terapia que funciona en todos los casos es la completa eliminación del alimento causante de la alergia, que como ya se ha mencionado anteriormente, puede producir ciertos inconvenientes en la vida del paciente y de las personas de su entorno, como problemas nutricionales provocados por la eliminación del alimento en cuestión, que podría causar deficiencias en pacientes de cualquier edad, pero que afectan más a los niños. Otro problema podría ser el cumplimiento de la dieta impuesta, ya que en ocasiones es difícil eliminar los alimentos, sobre todo cuando se trata de alimentos esenciales, como la leche o el huevo, que pueden encontrarse ocultos en comidas elaboradas. Por estas razones es de vital importancia la información, según la legislación vigente, sobre los ingredientes que componen o están presentes en los alimentos preparados comercialmente. También hay que tener en cuenta los problemas psico-sociales que pueden acarrear las dietas de eliminación, por la sobreprotección de los pacientes y por el esfuerzo económico y emocional que suponen. Finalmente pueden existir problemas de reintroducción, por ejemplo, que el paciente presente aversión por los alimentos suprimidos durante períodos prolongados ⁽⁵⁸⁾.

Los tratamientos más frecuentes de la alergia alimentaria son aquellos que tienen como fin paliar los síntomas de los pacientes utilizando fármacos. También existe la inmunoterapia específica o SIT, que consiste en la desensibilización de los pacientes mediante la administración de alérgeno en dosis crecientes, normalmente vía subcutánea, por períodos variables de tiempo, que suelen ser de varios meses para alcanzar la dosis de mantenimiento y de años para conseguir la tolerancia clínica e inmunológica ⁽⁶⁷⁾ ⁽⁶⁸⁾.

Este método se ha usado con éxito en los casos de alergia a pólenes y se ha visto que también puede mejorar algunos casos de alergia alimentaria producidos por reactividad cruzada con pólenes, como se ha descrito para la alergia a la manzana tratada con inmunoterapia con extracto de polen de abedul ⁽⁶⁹⁾. Sin embargo, la utilización de extractos naturales para terapia, como ya se dijo en lo que respecta a diagnóstico, presenta muchos problemas, sobre todo en lo que refiere a la estandarización de dichos extractos. Por ello es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias ⁽⁹⁾, entre las que destacan:

a. ADN plasmídico y secuencias CpG: Se busca conseguir una desviación de la respuesta inmune de tipo Th2 hacia una de tipo Th1 ⁽⁷⁰⁾. Para ello se utilizan plásmidos que contienen la secuencia del alérgeno. Esta técnica se ha utilizado con éxito para el alérgeno de látex Hev b 5 ⁽⁷¹⁾, Bet v 1 de abedul ⁽⁷²⁾ y Cry j 1 del cedro japonés ⁽⁷³⁾.

Las secuencias inmunoestimuladoras de ADN con motivos CpG (nucleótido citosina seguido de guanina, con un grupo fosfato uniendo ambas bases) son adyuvantes bacterianos que, también provoca una desviación hacia Th1 de la respuesta inmune, activando las células presentadoras de antígeno, las células citotóxicas y las células B ⁽⁷⁴⁾. Es decir, potencian la inmunogenicidad minimizando la alergenidad ⁽⁷⁵⁾.

b. Anticuerpos anti-IgE: comercializado con el nombre de Omalizumab, son anticuerpos monoclonales anti IgE, que bloquean su fijación a los receptores específicos de las células efectoras (mastocitos), reduciendo de este modo las respuestas alérgicas como las que provocan el asma o la rinitis estacional ⁽⁷⁶⁾.

c. Alérgenos recombinantes: la tecnología de ADN recombinante ha permitido la clonación de numerosas secuencias codificantes de proteínas alérgicas. Su posterior producción en sistemas heterólogos, como *Pichia pastoris*, *E. coli* o células de insecto infectadas por Baculovirus, entre otros, permite conseguir gran cantidad de estos alérgenos de manera estandarizada, lo cual contribuye a su caracterización como alérgenos. De los sistemas de

expresión existentes, tanto las levaduras *Pichia pastoris* como las células de insecto son excelentes para la producción de proteínas procedentes de organismos eucariotas, ya que permiten la incorporación de modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, que no son posibles en sistemas procariotas como *E. coli*.

6.1 Aplicaciones de los alérgenos recombinantes

La disponibilidad de una gran cantidad de alérgeno recombinante, purificado y estandarizado ha permitido determinar los epítomos T y B de algunos alérgenos. Para la identificación de los epítomos T, se diseñan unos péptidos a partir de la secuencia conocida del alérgeno, con las regiones potencialmente alergénicas, que inducirán la proliferación de los linfocitos T de los pacientes alérgicos y permitirán el mapeo de los epítomos T ⁽⁷⁷⁾ ⁽⁷⁸⁾. Para el mapeo de los epítomos B resulta de gran ayuda conocer la estructura terciaria de la proteína implicada, ya que en su mayoría son epítomos conformacionales. La identificación de estos epítomos se realiza evaluando la unión de IgE al alérgeno ⁽⁷⁹⁾ ⁽⁸⁰⁾ ⁽⁸¹⁾ ⁽⁸²⁾ ⁽⁸³⁾, para lo que ha resultado ser de gran utilidad la tecnología de los microarrays y los mimotopos.

Los mimotopos son péptidos capaces de unirse a un anticuerpo, por ser capaces de simular el comportamiento del antígeno natural. Existen dos tipos de simulación, la antigénica y la inmunogénica. En la primera el mimotopo es capaz de unirse al sitio de unión del anticuerpo y de competir con el antígeno natural por la unión a este sitio. Esto es suficiente cuando el objetivo es determinar la secuencia reconocida por el anticuerpo de interés, como en el caso del mapeo epitópico ⁽⁸⁴⁾, como se ha realizado en el alérgeno de melocotón Pru p 3 ⁽⁸⁵⁾. Cuando el fin es utilizar el mimotopo como candidato para la vacunación, éste habrá de mimetizar el comportamiento inmunológico (simulación inmunogénica) del antígeno natural ⁽⁸⁶⁾.

Otra aplicación de los alérgenos recombinantes es la obtención de formas mutantes, que puede conseguirse por distintos métodos: por cambios en nucleótidos concretos (gen mutado), por introducción de fragmentos de ADN en otro gen distinto (gen quimérico o híbrido) o por una delección del ADN (gen truncado). Las formas mutantes dan lugar a distintas características en los alérgenos, que facilitan su estudio a nivel molecular e inmunológico.

Los alérgenos recombinantes también tienen aplicaciones clínicas, sobre todo en lo que se refiere al diagnóstico y a la utilización de una futura inmunoterapia, ya que en la actualidad existen ciertas limitaciones legales en algunos países para la utilización de proteínas recombinantes en humanos.

En términos de diagnóstico pueden realizarse mezclas de alérgenos recombinantes, cada uno de ellos en concentraciones óptimas ⁽⁸⁷⁾ ⁽⁸⁸⁾, lo que mejoraría en gran medida los diagnósticos con extractos en los que existen alérgenos lábiles o en pequeñas concentraciones. Además permite realizar un perfil de cada paciente, o lo que se conoce como CDR (del inglés, Component Resolved Diagnosis) ⁽⁸⁹⁾.

En inmunoterapia sería de interés el generar modelos animales con alérgenos recombinantes que permitan evaluar diferentes terapias antes de ser aplicadas en humanos. Además, sería interesante poder llevar a cabo la inmunoterapia conocida como CRIT (del inglés component resolved immunotherapy) ⁽⁸⁷⁾, para lo que se utilizan cócteles de alérgenos recombinantes preparados según el patrón de sensibilización de cada paciente.

Por otro lado, el uso de hipoalérgenos recombinantes contribuiría a lograr que la inmunoterapia fuera más segura para el paciente, ya que con estas moléculas se consigue que haya una menor capacidad de unión de las IgEs. Estos hipoalérgenos no son sin embargo útiles en términos de diagnosis, ya que para este fin es necesario que los alérgenos que se están utilizando mantengan intacta su capacidad de fijación de inmunoglobulinas, por lo que resultan más adecuados los alérgenos recombinantes sin ninguna modificación.

En resumen, podemos decir que las proteínas recombinantes podrían ser de gran ayuda para lograr una estandarización de los extractos alergénicos para lograr un mejor diagnóstico, así como para el desarrollo de una inmunoterapia más segura basada en hipoalérgenos y mezclas de proteínas para el tratamiento específico de cada paciente.

7. Cucurbitáceas y sandía

A pesar de que la alergia a frutas es una causa muy frecuente de alergia alimentaria en adultos, que ha sido ampliamente estudiada, existen pocos estudios acerca de la alergia a los alimentos de origen vegetal pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas.

Las cucurbitáceas son una amplia familia de frutas y verduras que incluye, entre otras, melón, pepino, calabacín, calabaza, sandía, etc. La alergia a estas frutas no ha sido muy estudiada hasta la fecha, salvo por los estudios realizados en melón.

La alergia a melón es una de las más frecuentes dentro de las alergias a frutas ⁽⁹⁰⁾ ⁽⁹¹⁾, causando SAO como síntoma más característico ⁽⁹²⁾ ⁽⁹³⁾ ⁽⁹⁴⁾ ⁽⁹⁵⁾. Además provoca reacciones cruzadas con otras frutas ⁽⁹²⁾ ⁽⁹⁵⁾ ⁽⁹⁶⁾ y con látex ⁽⁹⁷⁾. Hasta la fecha han sido descritos tres alérgenos de esta fruta: Cuc m 1 ⁽⁹⁸⁾, Cuc m 2 ⁽⁹⁹⁾ y Cuc m 3 ⁽⁹²⁾.

Cuc m 1 es alérgeno principal y se caracteriza por ser una serín-proteasa alcalina homóloga a la subtilisina bacteriana, termoestable y que se encuentra glicosilada ⁽¹⁰⁰⁾. Tiene una masa molecular de 54 kDa en su forma madura ⁽⁹⁸⁾ y constituye el 10% de la proteína total de la fruta ⁽¹⁰⁰⁾. Cuc m 2, de 13 kDa, es el panalérgeno profilina, también alérgeno principal en melón ⁽⁹⁹⁾ y Cuc m 3, es una proteína de 16 kDa perteneciente a la familia de las proteínas de defensa PR-1 ⁽¹⁰¹⁾.

Además, se han realizado estudios para el mapeo de epítomos potenciales de unión a IgE de la profilina de melón, Cuc m 2, para lo que se han utilizado métodos basados en modelado tridimensional y análisis de péptidos sintéticos ⁽⁸²⁾. Así se han descrito dos epítomos principales que solapan parcialmente con el sitio de unión a actina: E1 (residuos 66-75 y 81-93) y E2 (residuos 95-99 y 122-131) y otros dos epítomos, con menor capacidad de unión a IgE: E3 (residuos 2-10) y E4 (residuos 35-45) ⁽⁸²⁾.

La sandía (*Citrullus lanatus*) es originaria de África, pero posteriormente fue distribuida al resto del mundo. En Europa, hay que destacar su elevado consumo en los países de la región mediterránea, particularmente en España, Italia y Grecia, que son los productores principales ⁽⁴⁵⁾. Es una fruta que posee un elevado contenido en agua (92%) y azúcares. Pueden considerarse dos grupos de variedades híbridas existentes en el mercado (figura 4):

- Variedades “**Tipo Crimson**”, de corteza rayada
- Variedades. “**Tipo Sugar Baby**”, de corteza verde oscuro.



Figura 4: Variedades de sandía. A la izquierda se puede observar el tipo “Crimson”, de corteza rayada, y a la derecha el tipo “Sugar Baby”, con corteza lisa y de color verde oscuro.

Dentro de ambos tipos pueden encontrarse sandías con semillas y sin semillas, aunque generalmente las sandías triploides (sin semillas) son “tipo Crimson”, por lo que la piel rayada está siendo un carácter diferenciador para el consumidor entre sandía con semillas y sin semillas.

Desde que en 1970 Anderson et al. ⁽⁹¹⁾ describieran la asociación entre los síntomas producidos por alergia al polen de ambrosía y los síntomas orofaríngeos inducidos por alimentos de origen vegetal en pacientes de los Estados Unidos, se ha estudiado muy poco acerca de la alergia a la sandía. En el año 1987 Enberg et al. ⁽¹⁰²⁾ demostraron la existencia de reactividad cruzada entre la sandía y polen de ambrosía y, un año después, describió la presencia de varias proteínas con capacidad de unir IgE, utilizando técnicas de isoelectroenfoque ⁽¹⁰³⁾. Siguiendo con estos estudios, Jordan-Wegner et al. ⁽¹⁰⁴⁾ observaron que los pacientes alérgicos a sandía presentaban reactividad frente a una proteína de aproximadamente 15 kDa y Asero et. al. ⁽¹⁰⁵⁾ describieron que existía una elevada prevalencia de SAO inducido al ingerir sandía en pacientes sensibilizados a profilina. A pesar de los grandes avances realizados hasta la fecha en lo que a caracterización de alérgenos alimentarios se refiere, hasta ahora no se había descrito ninguno de la sandía.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la identificación de los alérgenos implicados en las reacciones de alergia a sandía, así como su clonación y caracterización, con el fin de poder encontrar, en un futuro próximo, nuevas posibilidades en el diagnóstico y en el tratamiento de la alergia a sandía en concreto y de otras frutas en general, para lo que se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- 1) Caracterización de los pacientes con alergia a sandía.
- 2) Identificación de los alérgenos principales de sandía.
- 3) Purificación y caracterización de los alérgenos principales de sandía.
- 4) Clonaje de los alérgenos principales de sandía.
- 5) Comparación de las características inmunológicas entre las formas natural y recombinante de los alérgenos principales de sandía.

MATERIALES Y MÉTODOS_____.

Purificación y caracterización de proteínas

1. Soluciones y tampones:

1.1. Tampones

- **PBS** (Buffer phosphate saline): 20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 y 150 mM NaCl , pH 7.9.

- **PBS-T**: PBS con 0.1% (v/v) Tween 20.

- **PBS-T 0.05%**: PBS con 0.05% (v/v) Tween 20.

- **Tampón de solubilización**: 10 mM K_2HPO_4 pH 7, 2% (p/v) PVPP (polivinilpolipirrolidona) y 2 mM EDTA (ácido etilén-diamintetraacético disódico).

- **Tampón de carga de electroforesis**: 0.1 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% (p/v) SDS, 20% (p/v) glicerol, 10% (p/v) 2 β -mercaptoetanol y 0.02% (p/v) azul de bromofenol.

- **Tampón de electroforesis**: 0.025 M Tris-HCl, pH 8.3, 0.192 M glicocola y 0.1% (p/v) SDS.

- **Tampón NET**: 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl , 0.05 M EDTA, 0.5% (v/v) Tritón X-100, pH 7.5.

- **Solución de azul Coomassie R-250**: 0.3% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético.

- **Tampón de transferencia**: 4.8 mM Tris-HCl, 3.9 mM glicocola, 20% (v/v) metanol y 0.036% (p/v) SDS.

- **Tampón CAPS**: 10 mM Ácido 3-(ciclohexilamino-1-propanosulfónico) pH 11, 10% (v/v) metanol.

- **Tampón de bloqueo para ConcanavalinaA:** 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 2% (p/v) PVPP.
- **Solución de lavado de ConcanavalinaA:** PBS con 0.1% (v/v) Triton X-100.
- **Tampón de digestión con pepsina:** 0.7% (v/v) HCl, 30mM de NaCl, pH 1.2.
- **Tampón de bloqueo de ELISA:** 0.05% PBS-T con 2% (p/v) leche en polvo.
- **TAE:** 40 mM Tris-acetato (484 g/l de Tris-base y 1.14 ml/l de ácido acético glacial), 2 mM EDTA.
- **Tampón de aplicación de ADN (6x):** 0.25% (p/v) azul de Bromofenol, 0.25% (p/v) cianol de xileno, 30% (v/v) glicerol.

1.2. Medios de cultivo

- **BacPAK complete medium (Clontech):** Composición: Medio básico de Grace, (suplementado con yestolate, hidrolizado de lactoalbúmina, y L-glutamina), 10% FBS (suero bovino fetal) y gentamicina (50µg/ml).
- **BMGH:** 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 100 mM K₂HPO₄ pH 6.0, 400 µg/l de biotina, 10 ml/l de glicerol. Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.
- **BMGY:** 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 10 ml/l de glicerol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 100 mM K₂HPO₄, pH 6.0. Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.
- **BMMH:** 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 100 mM K₂HPO₄, pH 6.0, 400 µg/l de biotina, 5 ml/l de glicerol. Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.

- **BMMY:** 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 5 ml/l de metanol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 100 mM K₂HPO₄, pH 6.0. Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.

- **Grace medio básico (Clontech):** es un medio de cultivo básico comercial, que no contiene suplementos proteínicos.

- **Grace 2x medio básico (Clontech):** Medio de cultivo comercial que se utiliza suplementado con yeastolate, hidrolizado de lactoalbúmina, y L-glutamina.

- **LB (de baja fuerza iónica):** 1% (p/v) triptona bacteriológica, 0.5% (p/v) extracto de levadura y 0.5% (p/v) NaCl. Para el crecimiento de las células en medio sólido se añadió agar a 15 g/l. Para la selección de transformantes de *E. coli* con el vector pGEM se añadió al medio ampicilina (100 µg/ml) y para la selección de transformantes de *E. coli* (TOP 10) con el vector de expresión pPICZαA, se añadió al medio el antibiótico zeocina (25 µg/ml). Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.

- **MGYH:** 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 10 ml/l de glicerol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina, 100 mM K₂HPO₄, pH 6.0, 0.4g/l de histidina. Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.

- **MMH:** 5 ml/l de metanol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µg/l de biotina. Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.

- **SOC:** 2% (p/v) triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM glucosa. Se utilizó para el crecimiento de células *E.coli* (TOP 10) durante el proceso de transformación. Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.

- **YNB:** Base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos

- YPD: 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de D-glucosa, 15 g/l de agar (para medio sólido). Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.

- YPDS: 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de D-glucosa, 182.2 g/l de sorbitol, 15 g/l de agar (para medio sólido). Se esterilizó por autoclavado durante 21 min a 120 °C.

2. Producción de los extractos alergénicos

Los extractos fueron obtenidos a partir de la variedad de sandía *Citrullus lanatus lanatus*, la más consumida en España.

La pulpa de la fruta se homogeneizó con una licuadora y se siguió un protocolo de extracción de proteínas consistente en agitación magnética a 4 °C durante 12 horas, en presencia de tampón de solubilización. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 15000 x g a 4°C durante 2 horas. El precipitado, compuesto fundamentalmente por fibras y semillas, fue descartado. El sobrenadante, con las proteínas solubilizadas, fue esterilizado por filtración a través de un filtro con poro de 0.22 µm.

Para eliminar del extracto los azúcares y otros componentes no proteicos se realizó una cromatografía de intercambio aniónico utilizando la columna Q-Sepharose (GE-Healthcare) ⁽¹⁰⁶⁾. La muestra se dializó frente a tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.8 y posteriormente se cargó la columna con 200 ml de extracto de sandía y se eluyó con tampón Tris-HCl 50mM, 2 M de NaCl, pH 8.8.

Para realizar los experimentos *in vitro*, el eluido obtenido de la cromatografía se concentró utilizando el sistema de Amicon (Millipore) con membranas de celulosa y se dializó frente a bicarbonato amónico para eliminar el exceso de sales del extracto. La concentración se ajustó a 1 mg/ml.

3. Valoración de proteínas

Para calcular la concentración de proteínas presente en los extractos y de las proteínas purificadas se siguió el protocolo de Bradford ⁽¹⁰⁷⁾ utilizando el reactivo Coomassie Plus (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4. Purificación de proteínas alergénicas

Las proteínas alergénicas presentes en el extracto de sandía fueron purificadas por diferentes pasos cromatográficos utilizando un sistema FPLC AKTA Purifier (GE-Healthcare). Después de cada cromatografía, las fracciones que contenían las proteínas eluidas se dializaron frente a bicarbonato amónico, para reducir su concentración de sales y posteriormente fueron liofilizadas.

4.1. Columnas de cromatografía

- **HiPrep 16/10 DEAE FF** (GE-Healthcare): Columna de intercambio aniónico. Equilibrada en 50 mM Tris-HCl pH 7.4. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl desde 0 hasta 0.5 M.
- **Superdex 75 10/300** (GE-Healthcare): Columna de cromatografía de penetrabilidad. Equilibrada en tampón PBS.
- **Mono-Q 5/50 GL** (GE-Healthcare): Columna de intercambio aniónico. Equilibrada con 20 mM Tris-HCl pH 7.9. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 0 a 0.5M de NaCl.
- **Source 15PHE 4.6/100 PE** (GE-Healthcare): Columna de hidrofobicidad. Equilibrada con 20 mM Tris, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 1 M a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

- **Sepharose poly-proline** (preparada en el laboratorio): Equilibrada en 100 mM KCl, 100 mM Gly, 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT; pH 7.8 (tampón A). Tampones de elución: 100 mM KCl, 100 mM Gly, 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, 3 M urea; pH 7.8 (tampón B) y 100 mM KCl, 100 mM Gly, 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, 8M urea; pH 7.8 (tampón C).
- **Sepharose anti-MDH** (preparada en el laboratorio): Equilibrada en tampón PBS. Tampón de elución: 0.1 M glicocola, pH 2.5, Tampón de neutralización: 1 M Tris-HCl, pH 8.
- **HiTrap chelating** (GE-Healthcare): Equilibrada en 20 mM Na₂HPO₄, 0.5M NaCl y 20 mM de Imidazol. Las proteínas se eluyeron con 0.02 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl y 0.5 M de Imidazol.

4.2. Preparación de la columna de Sepharose poly-proline

La Sepharose 4B (GE-Healthcare) se lavó con una solución 1 mM HCl, mediante filtración por gravedad utilizando un filtro de cristal. Por otro lado, el ligando (poly-prolina, GE-Healthcare) se resuspendió en tampón de unión (0.1 M NaHCO₃ pH 8.3 con 0.5 M de NaCl). Posteriormente, la Sepharose se incubó utilizando el mismo tampón, durante toda la noche a 4 °C, en agitación, en presencia del ligando, en una relación de 1mg de poly-prolina/g de Sepharose 4B.

Tras centrifugar durante 5 minutos a 14.000 rpm en microfuga, se descartó el sobrenadante conteniendo el exceso de poly-prolina y se añadió el tampón de bloqueo de los grupos reactivos, consistente en 1 M Tris-HCl, pH 8.

Antes del montaje de la columna se realizaron 3 ciclos de lavados con pH alternantes, utilizando 0.1 M de ácido acético pH 4 y el tampón de unión, de pH 8, con el fin de eliminar uniones inespecíficas. Una vez montada la columna y para evitar las uniones inespecíficas, se cargaron 500 µl de suero humano, que se

lavó con tampón de equilibrado, y se eluyó con los tampones B y C. Finalmente la columna se equilibró en tampón A.

5. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis se llevaron a cabo según el método de Laemmli ⁽¹⁰⁸⁾. La polimerización de los geles y el desarrollo de las electroforesis se llevaron a cabo en los sistemas de Hoeffer y *Mini-Protean III* de Bio-Rad. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron los Broad Range (Bio Rad).

Las concentraciones de acrilamida fueron del 12% y del 14% (p/v) para el gel separador, según las necesidades específicas de cada caso, y del 5% (p/v) para el gel concentrador. Las muestras se prepararon en tampón de carga y, posteriormente, se desnaturalizaron calentando 5 minutos a 95 °C. Se cargó en cada pocillo una cantidad de proteína de 50 µg.

Los geles se corrieron a una intensidad constante de 25 mA, en tampón de electroforesis.

6. Visualización de proteínas en SDS-PAGE

Para su visualización, los geles se tiñeron con solución de azul Coomasie R-250 o con Coomassie Coloidal (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. Transferencia electroforética

Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (GE-Healthcare) según el método de Towbin et al. de transferencia semiseca ⁽¹⁰⁹⁾, con una intensidad de corriente constante de 1 mA/cm² de membrana durante 1 hora. La eficacia de la transferencia se comprobó mediante tinción de las membranas con el colorante rojo Ponceau para visualizar las bandas proteicas. Los marcadores de peso molecular (Bio-Rad), que no estaban preteñidos, se marcaron con un lápiz con el fin de visualizarlos posteriormente. Las membranas fueron desteñidas con agua para eliminar el colorante, antes de ser bloqueadas.

8. Identificación de proteínas:

8.1. Secuenciación de Edman:

La secuencia de la región amino terminal de proteínas se determinó mediante degradación de Edman automática, en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), de Madrid.

En este caso, se introducen algunas modificaciones en el protocolo de electroforesis ⁽¹¹⁰⁾: a) los geles se preparan con una antelación de 24 horas y se guardan a 4 °C, con el fin de permitir la completa polimerización de la acrilamida; b) se añade ácido tioglicólico al tampón de electroforesis de la parte superior de la cubeta hasta una concentración final de 0.002% (v/v) y c) los geles se corren durante 30-60 minutos a 10 mA antes de cargar las muestras.

En este caso, para la transferencia de las proteínas se utilizaron membranas ProBlott de PVDF (Applied Biosystems) con tampón CAPS, que posteriormente fueron teñidas con azul Coomassie, cortadas con un bisturí y secuenciadas. Para identificar las proteínas, las secuencias del extremo amino

terminal se analizaron informáticamente en un programa de BLAST disponible en el servidor Expasy (www.expasy.org).

8.2. Identificación de las proteínas por espectrometría de masas:

Las bandas que se deseaban identificar se cortaron del gel de poliacrilamida con un bisturí estéril y se digirieron con tripsina según el método de Shevchenko et al. ⁽¹¹¹⁾. Las proteínas digeridas en el gel fueron purificadas según el método descrito por Gobom et al. ⁽¹¹²⁾.

Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA). El espectrómetro fue calibrado con productos de la autólisis de la tripsina, resultando en una aproximación a la masa teórica de ± 50 ppm. Los espectros obtenidos se analizaron informáticamente para la identificación de las distintas proteínas. En algunos casos se llevó a cabo la identificación por MS/MS.

La identificación se realizó buscando las secuencias no redundantes en una base de datos (NCBI) utilizando el programa Mascot. Se utilizó una tolerancia de la masa monoisotópica menor a 50 ppm, permitiendo la falta de una escisión de la enzima de restricción. Entre las modificaciones permitidas se encuentran la carbamidometilación de las cisteínas (modificación fija) y la oxidación de las metioninas (modificación variable).

Estos experimentos fueron realizados en la Unidad de Proteómica de la Facultad de Farmacia (UCM), miembro de ProteoRed y en el servicio de Proteómica del Hospital Nacional de Paraplégicos.

9. Detección de glicoproteínas: Tinción con Concanavalina A

Para la detección de glicosilaciones en las proteínas recombinantes se utilizó el protocolo de tinción con la lectina concanavalina A (ConA), que se une a Alfa D Glucosa y Alfa D Manosa y que permite la detección de hasta 1 µg de proteína glicosilada.

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloquearon durante 1 hora con tampón de bloqueo para ConA y a continuación se incubaron durante 1 hora con la lectina biotinilada (10 µg/ml; Pierce), disuelta en el mismo tampón. Tras lavar la membrana con solución de lavado de ConA, ésta se incubó con estreptavidina peroxidasa 1:1000 durante 1 hora. El revelado se realizó incubando con 0.3 mg/ml de 3'-diaminobencidina-HCl (DAB) con 0.05% (v/v) de H₂O₂. La reacción se detuvo añadiendo agua destilada.

10. Sensibilidad a Pepsina

Con el fin de analizar la estabilidad de las proteínas del extracto de sandía a la digestión *in vitro*, se disolvieron las proteínas presentes en el extracto total de sandía a una concentración de 2 mg/ml en tampón de digestión, precalentado a 37 °C ⁽⁴⁴⁾. Posteriormente se añadió la pepsina A (Sigma) a una concentración final de 0.32% (p/v) y se incubó a 37 °C en agitación durante 30 minutos, en los que se tomaron alícuotas a distintos tiempos (30 segundos, 5 minutos, 15 minutos y 20 minutos, respectivamente) para comprobar la sensibilidad de las proteínas a la pepsina. El control negativo se realizó siguiendo el mismo protocolo sin añadir la enzima. Para detener la reacción se redisolvió las muestras en tampón de carga de electroforesis y se analizaron por inmunodetección con los sueros de los pacientes alérgicos a sandía.

11. Determinación de parámetros moleculares

11.1. Masa molecular y punto isoeléctrico

El cálculo teórico de la masa molecular y punto isoeléctrico de proteínas se llevó a cabo mediante el análisis de las estructuras primarias de las proteínas, gracias al programa ProtParam disponible en el servidor Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

11.2. Predicción de estructura secundaria

La predicción de estructura secundaria de proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos se llevó a cabo mediante la aplicación de métodos estadísticos descritos por Garnier y col. (1996), disponibles en el servidor Expasy: (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html).

11.3. Predicciones de hidrofobicidad y antigenicidad

A partir de las secuencias de aminoácidos de los distintas proteínas alergénicas, y utilizando el método estadístico de Welling y col. (1985), se obtuvieron los perfiles de antigenicidad (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>).

Las predicciones de hidrofobicidad se llevaron a cabo según el programa descrito por Kyte y Doolittle (1982), disponible en el servidor Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>).

11.4. Predicción de estructura terciaria

La obtención de modelos teóricos de estructura terciaria se llevaron a cabo empleando el programa Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997), disponible en el servidor Expasy (<http://swissmodel.expasy.org/>) ⁽¹¹³⁾ ⁽¹¹⁴⁾ ⁽¹¹⁵⁾.

Caracterización inmunológica

1. Caracterización de pacientes

Se estudiaron pacientes adultos procedentes de la consulta de alergia. Para realizar el diagnóstico de alergia alimentaria se siguió el protocolo aprobado por el Subcomité de reacciones adversas producidas por alimentos de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica (SEAIC).

El diagnóstico de la alergia a sandía se basó en los síntomas provocados al ingerir esta fruta, con resultados positivos en las pruebas cutáneas, confirmados con una provocación oral abierta para la pulpa de sandía. No fueron incluidos aquellos pacientes que presenten alguno de los siguientes criterios de exclusión:

- Pacientes embarazadas o lactantes.
- Pacientes con trastornos cutáneos o necesidad de medicación que impida una correcta valoración de las pruebas cutáneas.
- Pacientes con trastornos mentales que impidan el normal desarrollo del protocolo.
- Pacientes que no deseaban participar en el estudio.
- Situaciones en las que está contraindicada el uso de adrenalina. Aunque en principio no es previsible la presencia de reacciones sistémicas, como medida de precaución se evitará la inclusión de estos pacientes: isquemia cardíaca, hipertiroidismo, hipertensión arterial, tratamiento con betabloqueantes, etc.

La caracterización de los pacientes se puede dividir en tres pasos:

1. Historia clínica (anamnesis)

Se realizó un historial clínico a todos los pacientes en el servicio de alergia de la Fundación Jiménez Díaz.

2. Pruebas cutáneas

Se realizaron pruebas cutáneas de tipo SPPT con pulpa de sandía y una lanceta estéril (Alk-lancet, Alk-Abelló) siguiendo la técnica descrita por Dreborg et al. ⁽¹¹⁶⁾, siguiendo las instrucciones de la EAACI ⁽¹¹⁷⁾. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Se utilizaron como controles positivo y negativo una solución de 10 mg/ml de histamina y solución salina, respectivamente.

Se consideraron positivas aquellas pruebas cutáneas con una pápula de diámetro 3 mm mayor que la obtenida con el control negativo.

3. Provocación oral de tipo abierta

Se administraba a los pacientes una porción de sandía en pequeñas dosis que habían de masticar y tragar. Las dosis eran incrementadas hasta obtener una respuesta positiva o hasta que el paciente acababa la porción de completa sin experimentar síntomas.

Una vez seleccionados los pacientes se comprobó por inmunodetección la presencia de IgE específica a profilina en el suero.

2. Preparación de sueros

Se usaron los sueros de pacientes alérgicos a sandía y una mezcla de los mismos. Además sueros de personas no atópicas se utilizaron como controles

negativos. Todas las personas dieron su consentimiento informado acerca de la participación en el estudio (anexo I).

3. Anticuerpos utilizados y producción de anticuerpos policlonales

Se utilizaron anticuerpos comerciales (Nordic Immunology, Cultek) policlonales de cabra anti IgE humana, de cabra anti IgG de conejo y de cabra anti IgG de ratón, todos ellos conjugados con peroxidasa.

Los anticuerpos policlonales fueron producidos en el laboratorio ⁽¹¹⁸⁾ ⁽¹¹⁹⁾ mediante la inmunización intramuscular de un conejo macho de 3 Kg de peso, durante seis semanas consecutivas con 100 μ g de proteína purificada disuelta en 200 μ l de PBS junto con 350 μ l de adyuvante completo de Freund.

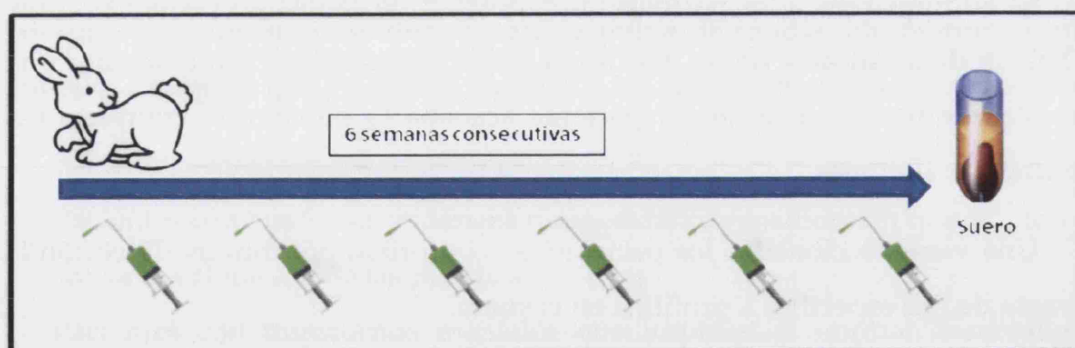


Figura 5: Esquema de inmunización de los conejos mediante inyecciones intramusculares.

En el caso del anticuerpo policlonal anti-profilina se inmunizó al conejo con profilina recombinante de sandía obtenida en el laboratorio, mientras que en el caso del policlonal anti-MDH la inmunización se realizó con una malato deshidrogenasa comercial procedente de corazón de cerdo (Sigma).

Se realizó una titulación mediante ELISA del anticuerpo obtenido, utilizando como fase sólida la proteína recombinante y BSA como control negativo e incubando con concentraciones decrecientes de anticuerpo, hasta establecer cuál era la dilución óptima.

4. Inmunodetección y ensayos de inhibición

En el caso de que las membranas fueran a ser incubadas con los sueros de pacientes alérgicos, el bloqueo se realizó con una disolución de PBS-T, 3% de leche desnatada y 3% de BSA, durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas transferidas y bloqueadas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los sueros de los pacientes diluidos 1/10 en tampón NET. Tras lavar durante 5 veces durante 5 minutos con PBS-T, las membranas se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo de cabra anti-IgE humana conjugado con peroxidasa diluido 1:5000 en PBS-T 0.05% y 1.5 % de leche desnatada.

Cuando las membranas se iban a incubar con un anticuerpo, se introducían algunas modificaciones: el bloqueo se realizaba con PBS/Tween 20 al 0.1% (PBS-T), 3% de leche desnatada, durante 1 hora a temperatura ambiente y los anticuerpos se preparaban en PBS-T 0.05% y 1.5 % de leche desnatada. El anticuerpo policlonal era usado a la concentración adecuada obtenida en la titulación. La concentración del anticuerpo secundario variaba de 1:5000 a 1:10000, según los requerimientos de cada experimento.

Finalmente, para visualizar las bandas proteicas se empleó el método de quimioluminiscencia enzimática revelando mediante ECL (GE-Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los ensayos de inhibición se realizaron de dos modos diferentes: A) Cuando se trataba de un ensayo de inhibición con una proteína purificada se preincubaban los sueros de pacientes con 15 µg de dicha proteína durante toda la

noche a 4 °C. B) Cuando se trataba de una inhibición con extracto completo, los sueros eran preincubados con 50 µg de proteína total durante toda la noche a 4 °C.

5. Enzimoinmunoensayo (ELISA) indirecto

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas de poliestireno Immunolon 4HBX de 96 pocillos (Thermo) de fondo plano y alta capacidad de unión, realizándose cada uno de ellos por duplicado.

Las placas eran tapizadas con 30 µg de extracto de sandía en un volumen de 100 µl por pocillo o con 2 µg de proteína purificada en 100 µl. En ambos casos el tampón en el que se diluían las proteínas era 0.05 M carbonato/bicarbonato pH 9.6 (Sigma). La incubación se realizaba a 4 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, las placas se lavaban tres veces con 100 µl por pocillo de PBS-T 0.05%. Tras los lavados, los sitios de unión inespecíficos eran bloqueados incubando las placas durante 1 hora a temperatura ambiente, con 200 µl por pocillo de tampón de bloqueo de ELISA. A continuación, las placas se incubaban durante 2 horas con los sueros de pacientes diluidos 1/10 en solución de bloqueo. Tras repetir los lavados con PBS-T 0.05%, se realizaba la incubación durante 1 hora con 100 µl por pocillo de un anticuerpo policlonal secundario anti-IgE humana conjugado con peroxidasa obtenido en cabra (dilución 1:2500). Tras repetir los lavados se revelaban de las placas con Tetrametil Benzidina (TMB sustrato ultrasensible, Chemicon). La absorbancia se determinó a 650 nm, a los 5 minutos, sin necesidad de parar la reacción.

6. ELISA de inhibición

Los sueros de los pacientes alérgicos a sandía se preincubaban sin diluir durante 2 horas a temperatura ambiente con distintas cantidades de los extractos proteicos de sandía o de las proteínas purificadas. Las cantidades de inhibidor utilizadas variaban de 10^{-5} a 10^1 μg de inhibidor/ml de suero. Transcurrido este tiempo, los sueros inhibidos se centrifugaban a 14.000 rpm en microfuga durante 5 minutos con el fin de eliminar los posibles inmunoprecipitados formados y se diluían 1/10 en tampón de bloqueo. Posteriormente, se transfirieron a la placa previamente tapizada y bloqueada, siguiendo el protocolo tal y como se ha descrito en el ELISA indirecto.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición obtenido frente a una concentración de inhibidor, que se calculó según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 [1 - (\text{DO}_{\text{obs}} - \text{DO}_{\text{bla}}) / (\text{DO}_{\text{max}} - \text{DO}_{\text{bla}})]$$

DO_{obs} = densidad óptica observada en presencia de inhibidor.

DO_{max} = densidad óptica en ausencia de inhibidor.

DO_{bla} = densidad óptica en ausencia del antígeno tapizado.

7. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS. Los estadísticos descriptivos incluían la frecuencia de los resultados positivos expresada en porcentaje, con un intervalo de confianza del 95% para las variables cualitativas y la media \pm desviación estándar media (SEM) para las cuantitativas.

Las correlaciones fueron calculadas con el estadístico de Pearson (r). Los valores fueron considerados significativos para valores de $P < 0.05$.

Clonación de proteínas alergénicas

1. Electroforesis de ácidos nucleicos

El análisis de plásmidos y fragmentos de DNA se realizó mediante geles de agarosa (Conda) al 0.5% (p/v) en tampón TAE, según Sambrook y col. ⁽¹²⁰⁾. El DNA se visualizó por tinción SYBR-Safe (Invitrogen) e iluminación con luz UV ($\lambda = 310$ nm).

2. Extracción de ARN

2.1 Extracción con Trizol

Para la extracción de ARN de sandía se utilizaron frutas de 2-3 semanas tras la polinización (2 cm de diámetro), con el fin de conseguir la mayor cantidad de ARN posible.

Tras la recolección de las frutas, éstas se cortaron en trozos de 1 cm de grosor aproximadamente y se introdujeron inmediatamente en solución ARN Later (Ambion). Se dejaron durante toda la noche a 4 °C, según las instrucciones del fabricante. El líquido sobrante fue descartado y los trozos de sandía se guardaron a -20 °C o fueron utilizados para la extracción de ARN.

Los fragmentos de sandía se congelaron con N₂ líquido y se pulverizaron con un mortero previamente esterilizado. Posteriormente se añadió el Trizol (Invitrogen) y se agitó hasta la homogenización total de la mezcla. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, añadiendo 200 µl de cloroformo por cada ml de trizol utilizado y se agita durante 15 segundos. Para la separación de las fases de ADN, proteína y ARN, se centrifugó la mezcla a 1.200 rpm en microfuga, a 4 °C durante 15 minutos.

Para la precipitación del ARN, éste se añadió sobre 0,5 ml de isopropanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para después centrifugarlo a 1200 rpm en microfuga, a 4 °C durante 15 minutos. Se recogió el precipitado y tras lavarlo con etanol al 70% y etanol absoluto, se dejó secar el precipitado. Finalmente, se resuspendió en H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato) (Ambion) y se cuantificó.

2.2 Cuantificación de ácidos nucleicos

Para la cuantificación de ácidos nucleicos se utilizó el sistema Nanodrop (Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó utilizando un $\lambda = 260$ nm.

2.3 Extracción con kit comercial

Trozos de sandía congelada en N₂ líquido se pulverizaron en un mortero previamente esterilizado. El ARN total se extrajo con el kit comercial “RNA Plant Kit” (Clontech), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

3. Producción de cADN: RT PCR

El cADN se sintetizó a partir del ARN total de sandía y se retrotranscribió a cADN usando el kit comercial Reverse Transcription System” (Promega), usando 1µg de ARN total como molde para la reacción.

4. Técnicas de amplificación de secuencias: PCR

La amplificación del cADN de las proteínas de interés (profilina y MDH) se realizó mediante la reacción de PCR:

Para una reacción de un volumen de 100 μ l se utilizó:

- 10 μ l de tampón de PCR 10x (Promega).
- 8 μ l de desoxinucleótidos (dNTPs), a una concentración de 2.5mM cada uno.
- 5 μ l de cada oligonucleótido (ida y vuelta) a una concentración de 10 μ M.
- 1ng de ADN plasmídico, que servirá como molde para la reacción.
- 2-3 unidades de polimerasa (Pfu, Takara)
- H₂O-mQ autoclavada, hasta un volumen de 100 μ l.

La mezcla obtenida se incubó durante 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C; 40 segundos a la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos (T_H) y 30 segundos a 72 °C, con un último paso de extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Los productos resultantes se analizan en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE.

5. Aislamiento de ADN plasmídico

El aislamiento del ADN plasmídico se realizó mediante lisis alcalina, centrifugación y precipitación utilizando el kit “Pure Yield Plasmid Midiprep System” de Promega, a partir de cultivos bacterianos de 25 ml en medio de cultivo LB, siguiendo las instrucciones del proveedor.

6. Enzimas de restricción

Las digestiones de ADN y de los plásmidos se llevaron a cabo con las enzimas de restricción correspondientes en cada caso, en presencia de BSA. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante toda la noche, o a 65 °C para el caso de las digestiones realizadas con la enzima de restricción Bstx I. En todos los casos, el volumen de enzima fue menor al 10% del volumen total de reacción, para evitar que el glicerol presente afectara a la reacción. Para parar la reacción enzimática, las mezclas de reacción se congelaron a -20 °C.

7. Ligación

Para la clonación de los fragmentos de ADN en el vector correspondiente se utilizó la ligasa del fago T4 (Promega). La mezcla, con una relación molar 5:1 (inserto: vector), se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Para calcular la cantidad de vector y de inserto se empleó la siguiente fórmula, donde la cantidad de vector utilizada fue de 50 ng.

$$\text{ng de Inserto} = [(\text{ng de Vector}) \times (\text{Kb de Inserto}) \times (\text{relación molar Inserto : Vector})] / (\text{Kb de Vector})$$

8. Técnicas de clonación

8.1. Clonación de Profilina

Para la clonación de la profilina se llevo a cabo el siguiente procedimiento:

Primero se clonó la proteína en el vector pGEM-T Easy (Promega), utilizando los oligonucleótidos ProWm5' y ProWm3' (tabla 2), diseñados en base

a las secuencias conocidas de las profilinas de tomate (número de acceso NCIB: Q93YG7) y melón (número de acceso NCIB: CAD92666):

ProWm5': 5' GCT GAA GCT ATG TCG TGG CAG(A/G)CG TA(C/T) GTC GATG
ProWm 3': 5' TTC AAT CCC CCC GAG GCC CTG CTC GAT AAG GT

El cebador ProWm 3', además de permitir la hibridación con la secuencia de la profilina, introduce parte de la secuencia del Factor Xa, necesario para la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular.

Posteriormente y usando como molde el vector pGEM-T Easy conteniendo la secuencia de la profilina, se prepararon los constructos para el vector de expresión pPicZαA mediante técnicas de PCR utilizando los cebadores (tabla 2):

RecKex: 5' CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ATG TCG TGG CA
Wm 3': 5' TCT AGA TCT CCC TTC AAT CCC CCC GAG GCC CT

El cebador RecKex permite la inserción dentro del marco de lectura del factor α presente en el plásmido pPICZαA e incluye una diana de restricción para la enzima Xho I. El cebador Wm 3', contiene una diana para la enzima de restricción Xba I y permite la fusión de la secuencia que codifica la profilina con el epítipo c-myc. Esto facilita la detección de la proteína recombinante mediante anticuerpos específicos. Además, la cola de histidinas facilitará la posterior purificación de la profilina, mediante cromatografía de afinidad.

8.2. Clonación de la Malato Deshidrogenasa

Para la clonación de la MDH se siguió la misma técnica que para la de la profilina. Esta vez los cebadores utilizados para la primera PCR fueron (tabla 2):

Malida: 5' CTG AAG CTA TGC AGC CGA TTC CG

Malvue: 5' TTC AAT CCC CCCC GCT TCT GAT GAA GGA ACC TCC

Para realizar la PCR que permite completar los constructos e introducir la secuencia de la MDH en el vector de expresión pPICZ α A, para su posterior producción en *Pichia pastoris*, los oligonucleótidos utilizados fueron:

Kex 2+Ste13 univ: 5' CTC GAG AAA AGA GAG CCT GAA GCT ATG

Malato vuelta: 5' GC GGC CGC TCT CCC TTC AAT CCC CCC

El cebador Kex 2+Ste13 univ permite la inserción dentro del marco de lectura del α -factor pPICZ α A e incluye la diana de Xho I. El cebador "Malato vuelta", permite la fusión con el epítipo c-myc y la cola de histidinas y contiene la secuencia de Not I.

Posteriormente, para su clonación en el vector pBacPAK9, para la producción de malato deshidrogenasa recombinante en células de Sf21 infectadas con Baculovirus, el vector pPICZ α A se digirió con las enzimas Xho I y Not I para liberar el inserto, que se ligó con el nuevo vector de expresión, previamente digerido con las mismas enzimas.

	Cebadores	Profilina	TM	Malato deshidrogenasa	TM
1ª PCR	Cebador de ida	ProWm5': 5'GCT GAA GCT ATG TCG TGG CAG (A/G)CG TA(C/T) GTC GAT G	76 °C	Malida: 5'CTG AAG CTA TGC AGC CGA TTC CG	45 °C
	Cebador de vuelta	ProWm 3: 5'TTC AAT CCC CCC GAG GCC CTG CTC GAT AAG GT	59 °C	Malvue: 5'TTC AAT CCC CCCC GCT TCT GAT GAA GGA ACC TCC	59 °C
2ª PCR	Cebador de ida	RecKex: 5' CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT ATG TCG TGG CA	57 °C	Kex 2+Ste13 univ: 5'CTC GAG AAA AGA GAG CCT GAA GCT ATG	37 °C
	Cebador de vuelta	Wm 3': 5'TCT AGA TCT CCC TTC AAT CCC CCC GAG GCC CT	63 °C	Malato vuelta: 5' GC GGC CGC TCT CCC TTC AAT CCC CCC	33 °C

Tabla 2: Resumen de los cebadores utilizados para la clonación de la profilina y de la Malato deshidrogenasa.

9. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó por el servicio de secuenciación de la empresa Secugen (CIB).

10. Microorganismos

10.1. Cepas de *E. coli*

- **Top10:** F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (*Str^R*) *endA1 nupG*.

10.2. Cepas de *P. pastoris*

- **GS115:** presenta un genotipo *his4*, que se traduce en un fenotipo His- Mut+. La capacidad de utilizar metanol como fuente de carbono se presenta inalterada, ya que no existe mutación del gen AOX1, mientras que el fenotipo His- significa una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa *HIS4*, enzima implicada en la biosíntesis de histidina por lo que este aminoácido deberá ser supelementado.

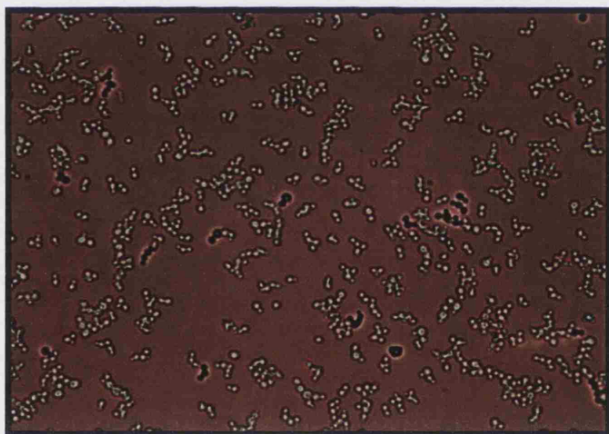


Figura 6: Imagen de *Pichia pastoris* al M.O óptico (40 aumentos).

10.3. Células de insecto

- **IPLB-Sf21:** abreviadamente se llaman células Sf21. Son células derivadas de las larvas del insecto *Spodoptera frugiperda* ⁽¹²¹⁾. Son proporcionadas en el kit comercial BacPAK Baculovirus Expression System (Clontech).

El largo genoma de Ac-MNPV (*Autographa californica multiple Nucleopolyhedrovirus*) más conocido como baculovirus, el prototipo de la familia *Baculoviridae*, dificulta mucho su manipulación. Por ello la clonación de las proteínas recombinantes se realiza en dos pasos. Primero, el gen de la proteína de interés se introduce dentro de la secuencia modificada del locus de la polihedrina

en un vector relativamente pequeño (menos de 10 kb), llamado vector de transferencia.

En un segundo paso, el vector de transferencia y un vector de expresión viral se cotransfectan en células de insecto, en este caso las células IPLB-Sf21. El sistema BacPAK (Clontech) utiliza el BacPAK6 como vector viral.

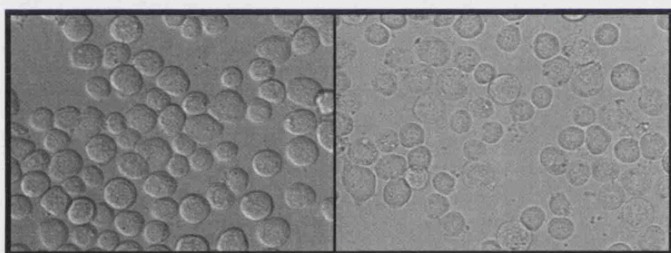


Figura 7: Imagen de células Sf21 sanas vistas al M.O óptico (40 aumentos).

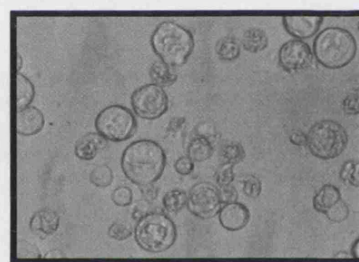


Figura 8: Imagen de células Sf21 infectadas con Baculovirus conteniendo el gen de la MDH vistas al M.O óptico (40 aumentos).

11. Vectores plasmídicos de clonación

pGEM (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega): Se utilizó para clonar los fragmentos de ADN obtenidos por PCR siguiendo el protocolo de ligación propuesto por Promega.

12. Vectores plasmídicos de expresión

12.1. Vectores plasmídicos para la expresión en *P. pastoris*

pPICZαA: (EasySelect. *Pichia* Expression Kit, Invitrogen). Plásmido de 3.6 kb, que contiene un gen de resistencia al antibiótico zeocina para la selección de las células transformantes. Presenta además la región promotora y otra de

terminación de la transcripción del gen *AOX1*, entre las cuales se encuentra el sitio de clonación múltiple, lo que permite clonar el gen de interés bajo el control de dicho promotor. A continuación del promotor se encuentra la señal de secreción del factor α de *S. cerevisiae* que permite la secreción de la proteína recombinante hacia el medio extracelular. Las proteínas clonadas en este vector se expresan como proteínas de fusión junto a una cola de Histidinas, que facilita su purificación mediante cromatografía de afinidad, gracias a la columna HiTrap Chelating (GE-Healthcare).

12.2. Vectores plasmídicos para la expresión en Baculovirus

pBacPAK 9: Es un vector relativamente pequeño, de 5.5 kb, también conocido como vector de transferencia, que facilita la manipulación del genoma de Ac-MNPV (Baculovirus). La secuencia de la polihedrina ha sido eliminada y en su lugar se ha añadido un sitio de clonación múltiple, en el que se introducirá el gen de interés, entre el promotor de la polihedrina y las secuencias de poliadenilación. Este vector contiene, además, un origen de replicación y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina para la selección de las células transformantes. Este vector es capaz de propagarse en células de *E.coli*, pero no en células de insecto.

13. Transformación de células de *E. coli*

Para la clonación de los fragmentos de ADN en el vector pGEM se siguió el protocolo descrito por Sambrook y col ⁽¹²⁰⁾. Se utilizaron tanto la ligasa del fago T4, como el tampón de ligación incluidos en el kit del vector (Promega). La mezcla, con una relación molar 1:5 de vector e inserto, se incubó durante toda la noche a 4 °C. Tras la ligación del inserto con el vector, se transformaron células

competentes TOP 10 de *E.coli* con la mezcla de la ligación, para lo que se incubaron durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se permearon las membranas celulares por choque térmico, incubando 90 segundos a 42 °C, enfriando después en hielo durante 2 minutos. Se añadió 1 ml de medio SOC para permitir la expresión de la resistencia a ampicilina en las células, y se incubó durante 1 hora a 37 °C en agitación a 200 rpm en un baño. Finalmente, las células se “plaquearon” en medio LB-agar con ampicilina o zeocina, según el gen de resistencia incluido en el vector. Las células transformadas se seleccionaron por PCR de colonias, siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

13.1 PCR de colonias

La selección de células transformadas se realiza por PCR de colonias, utilizando la mezcla Master Mix (Qiagen), que contiene el tampón de PCR, los dNTPs y BSA, necesarios para la reacción.

Para una reacción de un volumen de 100 µl se utilizó:

- 12.5 µl de mezcla Master Mix (Qiagen).
- 1 µl de cada cebador (ida y vuelta) a una concentración de 10 µM.
- 2-3 unidades de polimerasa (Pyrobest, TAKARA)
- H₂O_{MQ} autoclavada, hasta un volumen de 25 µl.
- El ADN se obtiene picando las colonias con un palillo estéril.

Como control positivo se añadieron 0.5 µl vector comercial sin digerir. Las colonias transformadas son aquellas para las que se obtenía una banda de ADN tras la PCR.

14. Almacenamiento de cultivos bacterianos y de levaduras: Stock de glicerol

Para almacenar cultivos durante largos períodos de tiempo se prepararon stocks en glicerol. Para ello es necesario inocular el medio LB o SOC con las bacterias (si se van a almacenar levaduras, el preinóculo se hace en medio YPD) que se quieren almacenar y se dejan crecer durante 16-20 horas a 37 °C en agitación en un baño si se trata de bacterias o a 30 °C en agitación en un incubador si se trata de levaduras. Posteriormente, se centrifuga 2000 x g y se elimina la mitad del sobrenadante, el precipitado se resuspende y se alícuota en volúmenes de 1 ml, a lo que se le añaden 300-500 µl de glicerol previamente autoclavado. La mezcla se congela en N₂ líquido y finalmente se guarda a -80 °C.

Proteínas recombinantes

1. Expresión en *Pichia pastoris*

1.1. Transformación de células de *P. pastoris*

Las células de *P. pastoris* (GS115) fueron tratadas para volverlas competentes, siguiendo las instrucciones del fabricante (Pichia EasyComp Kit, Invitrogen). Para llevar a cabo su transformación, se incubaron en hielo durante 5 min las células de *P. pastoris* junto con 10 µg del plásmido conteniendo el inserto resuspendido en un volumen de 5 µl de agua estéril y linearizado con la enzima de restricción *Bst*X I. Por último, las células se sembraron en placas YPDS/zeocina y se incubaron a 30 °C durante 2-4 días hasta la aparición de colonias.

1.2. Producción de proteínas recombinantes

Para realizar las pruebas de expresión a pequeña escala (5 ml), se seleccionaron varias colonias transformantes de *P. pastoris*, con el fin de seleccionar aquellas colonias con mayor rendimiento en la producción de proteína recombinante, así como el tiempo de incubación que resultaba más adecuado.

Las células transformantes se cultivaron en un incubador durante 24 h a 30 °C y 250 rpm en 5 ml de medio de crecimiento (BMGY, BMGH o MGYH). A continuación las células se recogieron por centrifugación a 4000 x g durante 10 min. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 10 ml de medio de inducción (BMMY, BMMH o MMH). Este cultivo se continuó durante 4 días a 30 °C, añadiendo diariamente metanol hasta una concentración final de 0.5 % (v/v). La producción de proteínas recombinantes se analizó mediante PAGE-SDS e

inmunodetección con alícuotas del sobrenadante de los cultivos tomadas a distintos tiempos de inducción (24, 48, 72, 96, 120 y 144h).

La producción a gran escala (25 ml) se llevó a cabo con la colonia que mostraba mayor nivel de expresión en los experimentos a pequeña escala y al tiempo de incubación que en el que se producía mayor cantidad de proteína recombinante.

1.3. Purificación de proteínas recombinantes

El medio de cultivo se separó de las células por centrifugación a 4000 x g durante 20 minutos, descartándose las células. El sobrenadante se cargó en la columna de afinidad HiTrap Chelating (GE-Healthcare) equilibrado en 20 mM Na₂HPO₄, 0.5M NaCl y 20 mM de Imidazol. Las fracciones con las proteínas recombinantes purificadas fueron eluidas con 0.5 M de imidazol. Estas fracciones fueron dializadas frente a 0.1 M bicarbonato amónico y concentradas, ajustándose su concentración a 1 mg/ml.

1.4. Detección de proteínas recombinantes

1.4.1. Anticuerpos específicos

Las proteínas recombinantes fueron detectadas mediante el uso de los anticuerpos específicos Anti-*myc*-HRP (Invitrogen) y anti-His(C-term) (Invitrogen), que detectan las secuencias del epítipo c-*myc* y de la cola de polihistidinas, respectivamente, añadidas a la secuencia de la proteína recombinante al ser expresada en el vector pPICZαA como proteína de fusión.

El anticuerpo Anti-*myc*-HRP se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante y la dilución óptima se estableció en 1:500. El anticuerpo anti-His(C-

term) se utilizó a una concentración de 1:1000 y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón producido en cabra conjugado con peroxidasa de Nordic Immunology (Cultek) a una concentración de 1:2500.

1.4.2. Tinción de la cola de histidinas

Se realizó una tinción específica de las proteínas de fusión con cola de histidinas, utilizando el reactivo comercial InVision His-Tag In-gel Stain (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Expresión en Baculovirus

2.1 Cultivo de células de insecto (Sf21)

Las células se cultivaron en monocapa en el medio pBacPAK completo (Clontech) utilizando frascos de cultivo de 25, 75 y 150 cm² (Iwaki).

Para el establecimiento de la línea celular se trabajó siempre en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (Telstar AV-100):

A partir de una alícuota de células (kit BacPAK Baculovirus Expression System) almacenada en N₂ líquido, se sembró un frasco de cultivo de 25 cm² al que se añadieron 5 ml de medio de cultivo pBacPAK completo precalentado a 27 °C, que se incubó a la misma temperatura durante 7 días. A partir de ese frasco de cultivo se fue aumentando progresivamente el tamaño y el número de frascos de cultivo hasta obtener una cantidad suficiente de células para realizar la cotransfección de las células Sf21.

Para realizar los pases, una vez que las células presentan una confluencia del 80-90% al observarlas en un microscopio óptico invertido, se retiraba el medio de cultivo y se añadía un pequeño volumen de medio nuevo (2 ml para los frascos de cultivo de 25 cm², 4 ml para los de 75 cm² y 6 ml para los de 150 cm²)

para levantar las células adheridas a la placa usando un “scraper” de silicona antes de traspasar el cultivo a un frasco de cultivo nuevo. Se incubaban a 27 °C durante 2-3 horas y se cambiaba de nuevo el medio de cultivo. Antes de realizar un nuevo pase de las células, éstas se incubaban a 27 °C durante 3-4 días.

2.2 Almacenamiento de células de insecto (Sf21)

El almacenamiento de células en N₂ líquido permite tener siempre una fuente de células frescas para reemplazar las viejas o contaminadas.

Se recogen las células de un frasco de cultivo de 150 cm² con una confluencia mínima del 80% y se comprueba que sean viables al menos el 90% de ellas. Se pasan 2*10⁶ células/ml en criotubos (Nalgene Crioware) con DMSO (Pierce) al 10% (v/v) y se congelan progresivamente: primero a -80 °C y finalmente se almacenan en N₂ líquido.

2.3. Cotransfección de células de insecto Sf21

Las células de insecto (Sf21) se transfectaron simultáneamente (cotransfección), siguiendo las instrucciones de la casa comercial Clontech, con 250 ng de ADN de la cepa pBacPAK6 de baculovirus, que contiene el gen de la β -galactosidasa bajo el control del gen de la polihedrina del virus, predigerido con Bsu36 I (Clontech), lo que lo convierte en ADN no infectivo, y con 500 ng del vector pBacPAK9 que contenía el gen de interés (gen de la MDH). La recombinación homóloga entre el ADN viral y el vector produce virus recombinantes con un rendimiento cercano al 100%, con la secuencia del gen de interés insertada en el genoma viral.

Para la cotransfección se sembraron 3 pocillos de una placa de cultivo de 6 pocillos (Iwaki) con 1*10⁶ células, que se incubaron a 27 °C durante 1h.

Posteriormente se eliminó el medio de cultivo viejo y se añadió medio nuevo y la mezcla de cotrasfección que contenía para el experimento:

- 86 μ l de agua estéril
- 5 μ l de vector que contenía el gen de la MDH (100 ng/ μ l)
- 5 μ l del ADN viral y 4 μ l de bacfectina (Clontech).

Para el control negativo se añadieron las mismas cantidades, sustituyendo el ADN viral por agua destilada. El tercer pocillo se dejó únicamente con las células en medio de cultivo, también como control negativo. Se incubó la placa P6 durante 5 h a 27 °C y se añadió 1.5 ml de medio nuevo para evitar que se secaran las células. Transcurridas aproximadamente 72 horas de la cotransfección, se recogieron los sobrenadantes de los pocillos que contenían los virus producidos en las células transfectadas.

Cuando el efecto citopático de las células fue total, el sobrenadante se pasó por tres rondas sucesivas de plaqueo para conseguir el virus recombinante purificado (ver “Plaqueo de virus”).

2.4. Infecciones con baculovirus

Las infecciones de baculovirus en células de insecto Sf21 se realizaron a la multiplicidad de infección adecuada para cada experiencia.

El medio de cultivo en el que crecían las células en monocapa era retirado y se añadía medio nuevo junto con el virus obtenido en la cotransfección incubando la mezcla a 27 °C.

2.5. Obtención del inóculo vírico

Los inóculos de baculovirus se obtenían mediante la infección de células Sf21 durante 48-96 h. El sobrenadante de estas células era recogido y se mantenía

a 4 °C protegido de la luz, para su conservación en el tiempo o se utilizaba para la infección de nuevos cultivos de Sf21.

2.6. Plaqueo del virus y purificación de baculovirus recombinantes

Los plaqueos de los baculovirus recombinantes se llevaron a cabo sobre células Sf21 sembradas en placas de 6 pocillos (Iwaki) a una densidad de 150.000 células/cm² (10⁶ células por pocillo). Las placas se dejaron durante una hora en el incubador para que se pegaran las células. Posteriormente se retiró el medio y se añadió medio nuevo. A continuación se infectaron las células con el virus. Transcurrida una hora desde la infección, se retiró el inóculo vírico y se añadió agarosa (Invitrogen) al 2% (p/v) mezclada con el mismo volumen de Medio básico de Grace 2x. Una vez solidificada la agarosa, a temperatura ambiente, se cubrieron los pocillos con medio BacPAK completo. Los cultivos se incubaron a 27 °C en cámara húmeda para evitar la desecación de la agarosa.

Las placas de lisis producidas por los virus comenzaron a observarse a partir de los cinco días post-infección. Su identificación se realizó al añadir al quinto día el colorante rojo neutro (Sigma) al 0,03% (p/v) en PBS e incubarlo durante 5 horas a 27 °C.

Las placas de lisis se aislaron con una pipeta Pasteur y se guardaron a 4 °C protegido de la luz para su conservación en el tiempo. Para la completa purificación de los virus recombinantes, se realizaron tres rondas sucesivas de plaqueo.

2.7. Ensayos de Titulación

Se realizaron sembrando 1,5* 10⁶ células/pocillo en 1,5 ml de medio BacPAK completo en placas de 6 pocillos (Iwaki). Una vez que las células estaban adheridas a la superficie de la placa de cultivo, se eliminó el medio de cultivo y se

sustituyó por 100 µl de diluciones seriadas de una suspensión baculovirus que contenían la secuencia de la MDH, desde 10^{-3} hasta 10^{-7} . Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Se incubó a 27 °C durante 3 horas, para permitir que los virus infectaran las células. Transcurrido ese tiempo se eliminó el inóculo vírico y se añadió 1.5 ml de Medio básico de Grace 2x con agarosa al 1% (p/v), previamente autoclavado, con cuidado de no dañar las células. Una vez solidificada la agarosa se añadió medio 1.5 ml de BacPAK completo a cada pocillo y se incubaron a 27 °C en la cámara húmeda para evitar la desecación de la agarosa.

Las placas de lisis producidas comenzaron a observarse de 3 a 5 días postinfección, y su identificación mejoró al añadir rojo neutro (Sigma) al 0,03% en PBS a los 5 días postinfección durante 3-5 horas. Para identificar las placas de lisis con mayor facilidad se eliminó el colorante rojo neutro y se almacenaron las placas durante 8-12 horas preservadas de la luz.

Para calcular la titulación de los inóculos, que se mide en unidades formadoras de placa/ml (ufp/ml), se contó el número de placas de lisis y se multiplicó por el factor de dilución correspondiente en cada caso. Como se habían añadido 100 µl de inóculo vírico, la fórmula utilizada para calcular el título vírico es:

$$\text{Ufp/ml} = (\text{Media del n}^\circ \text{ de placas de lisis de cada pocillo}) \times 10 \times (\text{factor de dilución})^{-1}$$

Evaluación de la actividad biológica de alérgenos purificados (naturales y recombinantes)

1. Activación de basófilos

Esta técnica se llevó a cabo utilizando el kit Basotest (Orpegen Pharma), que permite la determinación cuantitativa de la desgranulación de los basófilos en sangre humana completa heparinizada, después de su incubación con alérgenos.

Las muestras de sangre se incuban con concentraciones crecientes de alérgeno, así como con un control positivo (el péptido N-formyl-Met-Leu-Phe o fMLP) que siempre provocará la activación y desgranulación de los basófilos y con un control negativo, suero salino isotónico. La sangre de los pacientes y de los controles negativos (no atópicos) se incubó con concentraciones crecientes de alérgeno purificado, desde 0.02 µg hasta 20µg por cada 100 µl de sangre. Esto permite averiguar el umbral de activación que presenta cada paciente frente a los distintos alérgenos.

La activación de los basófilos induce la fusión de los gránulos citoplasmáticos con la membrana celular, liberándose al medio extracelular distintos mediadores inflamatorios. Las células se unen a anticuerpos monoclonales producidos en ratón conjugados con distintos fluorocromos. Los basófilos son marcados con el monoclonal anti-IgE marcado con ficoeritrina (anti-IgE-PE), mientras que los basófilos activados son reconocidos por el anticuerpo anti-gp53-FITC conjugado con fluoresceína y que reconoce la glicoproteína gp53 expresada en estas células cuando estas están activadas. Finalmente, el porcentaje de basófilos activados es determinado por citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

RESULTADOS

Caracterización de los pacientes

Los pacientes se seleccionaron entre aquellos que acudían al servicio de Alergología de la Fundación Jiménez Díaz.

El diagnóstico de la alergia se basó en una clara relación entre la ingestión de sandía y aparición de síntomas compatibles con enfermedad alérgica, en la cual se demostró la presencia de un mecanismo mediado por anticuerpos de tipo IgE y que fue confirmado con pruebas de provocación oral ⁽¹²²⁾.

Las características de los pacientes aparecen recogidas en la tabla 3. La edad media fue de 24.8 años con un intervalo de edad entre los 7 y 53 años, de los que el 56.5% eran hombres y el 43.5%, mujeres.

Todos los pacientes seleccionados presentaban polinosis asociada, presentando el 21.7% (5 de 23 pacientes) rinitis durante la temporada de polinización y un 78.3% (13 de 23 pacientes) rinitis y asma.

Paciente	Edad (años)	Sexo	Síntomas	Alergia al polen	Síntomas de alergia al polen
1	7	F	SAO	SÍ	R
2	20	M	SAO	SÍ	RA
3	21	M	SAO	SÍ	RA
4	23	F	SAO	SÍ	R
5	26	F	SAO	SÍ	RA
6	39	M	SAO	SÍ	RA

7	5	M	SAO	SÍ	RA
8	32	F	SAO	SÍ	RA
9	33	F	SAO	SÍ	RA
10	20	M	SAO	SÍ	R
11	32	F	SAO	SÍ	R
12	27	M	SAO	SÍ	RA
13	29	M	SAO	SÍ	RA
14	7	M	SAO	SÍ	RA
15	38	M	SAO	SÍ	RA
16	15	M	SAO	SÍ	RA
17	22	F	SAO	SÍ	RA
18	20	F	SAO	SÍ	RA
19	29	F	SAO	SÍ	RA
20	29	M	SAO	SÍ	R
21	18	M	SAO	SÍ	RA
22	53	M	SAO	SÍ	RA
23	26	F	SAO	SÍ	RA

Tabla 3: Características de los pacientes alérgicos a sandía que participaron en el estudio. Abreviaturas utilizadas: SAO (síndrome de alergia oral), R (rinitis), RA (rinitis y asma).

Purificación y Caracterización de proteínas

1. Identificación de las proteínas alergénicas de sandía

Con el fin de identificar las proteínas causantes de las reacciones alérgicas a la sandía, se preparó un extracto proteico de esta fruta, cuyas proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. La tinción con azul Coomassie reveló la presencia de múltiples proteínas con masa molecular comprendida entre 8 y 120 kDa (figura 9, carril 1). Se realizaron pruebas de inmunodetección utilizando sueros de pacientes, tanto de forma individual como una mezcla de ellos. Los pacientes presentaban IgE frente a varias proteínas, con masas moleculares comprendidas entre los 12 y 70 kDa aproximadamente (figura 9, carril 2).

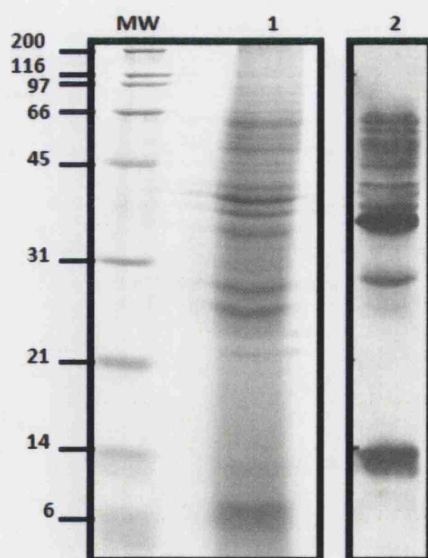


Fig. 9: SDS-PAGE (14%) de las proteínas de sandía (carril 1). Inmunodetección con pool de sueros de pacientes (1/10 en NET 1X) alérgicos a sandía (carril 2). Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles e inmunodetecciones, expresadas en kDa.

La inmunodetección realizada utilizando los sueros de pacientes individuales (Figura 10) reveló la existencia de tres bandas de gran intensidad, con masas moleculares de 36, 28 y 14 kDa, aproximadamente y que eran reconocidas por más del 50% de los pacientes, concretamente, la profilina era reconocida por el 56%, la MDH por el 96% y la TPI, por el 78%, por lo que fueron consideradas alérgenos principales de sandía. Algunos pacientes presentaron, además, reactividad frente a un grupo de bandas proteicas de elevada masa molecular.

Como control negativo se utilizó el suero de pacientes no atópicos, en los cuales no se observó reactividad alguna.

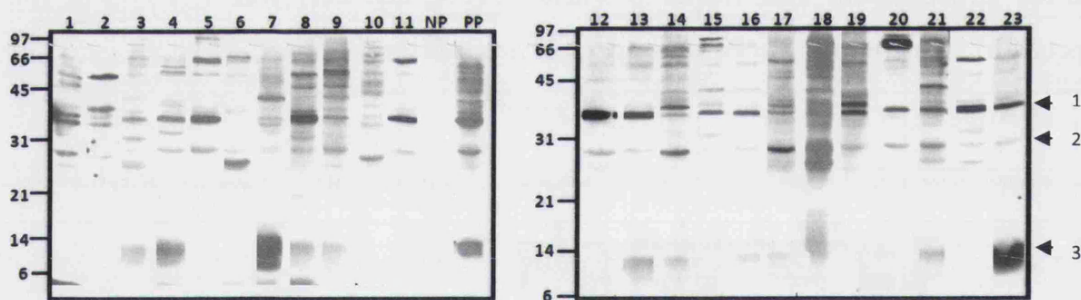


Fig. 10: Ensayos de inmunodetección con sueros individuales de pacientes alérgicos a sandía. Se muestran distintos patrones de unión de IgE a proteínas alérgénicas del extracto de sandía. Se señalan las bandas proteicas correspondientes a los tres alérgenos principales de sandía: 1) MDH, 2) TPI, 3) Profilina. NP: Paciente no atópico: control negativo. PP: mezcla de sueros de pacientes: control positivo. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de las inmunodetecciones, expresadas en kDa.

2. Identificación y caracterización de las proteínas alergénicas: secuenciación de Edman y Espectrometría de Masas

Los alérgenos principales de sandía (bandas de 36, 28 y 14 kDa), reconocidos por más del 50% de los pacientes, fueron analizadas mediante degradación de Edman, con el fin de determinar las secuencias de sus extremos amino-terminales.

Los extremos amino-terminales de las bandas proteicas de 28 y 14 kDa no pudieron ser secuenciados por encontrarse supuestamente bloqueados. En el caso de la banda de 36 kDa se pudo determinar la secuencia de 7 aminoácidos del extremo amino-terminal (ATESVPE), que corresponden a la malato deshidrogenasa de sandía (MDH) (GI:126896), lo cual fue confirmado posteriormente mediante análisis de MS/MS (tabla 4).

Para identificar las bandas de 28 y 14 kDa, se realizaron análisis de MS/MS, obteniéndose las secuencias de varios péptidos internos: VIACVGETLEQR y FFVGGNWK para la proteína de 28 kDa y por otro lado LGDYLVEQGL y YMVIQGEPGAVIR para la proteína de 14 kDa (tabla 4).

La identificación de las proteínas se completó mediante la búsqueda en la base de datos del NCBI, usando el programa Mascot (<http://www.matrixscience.com>), lo que condujo a la identificación de la proteína de 14 kDa como profilina (GI: 52352488).

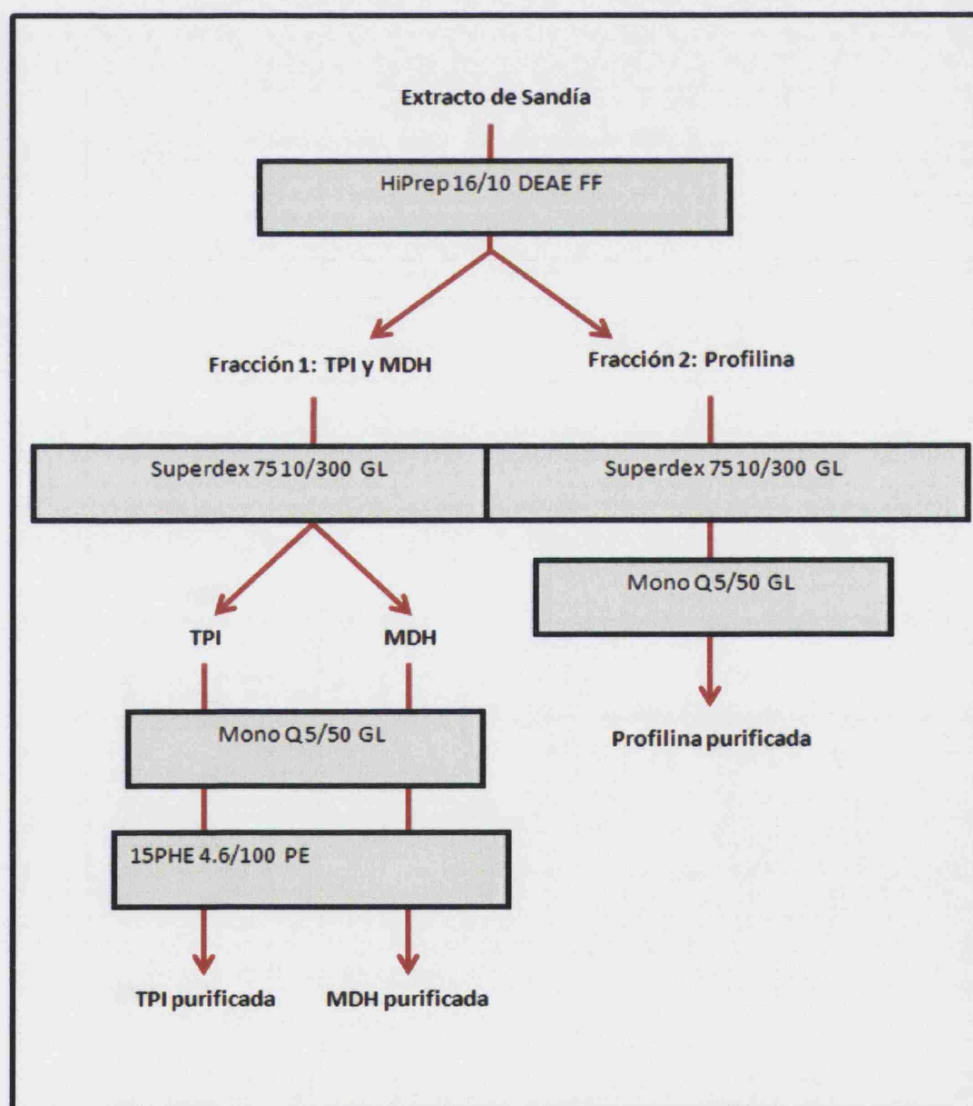
Los péptidos de la proteína de 28 kDa mostraron una elevada similitud con la triosa fosfato isomerasa (TPI) de especies relacionadas, como *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Spinacea olerace*, entre otras, pero no pudo identificarse como la TPI sandía, por no estar aún secuenciada.

Proteína	Péptido del extremo N-terminal	Péptidos MS/MS	Identificación
36 kDa	ATESVPE	ANLSDDTIVALTK	Malato deshidrogenasa GI:126896
28 kDa	-	VIACVGETLEQR/ FFVGGNWK	Triosa Fosfato Isomerasa
14 kDa	-	LGDYLVEQGL/ YMVIQGEPGA VIR	Profilina GI:52352489

Tabla 4. Resumen de los péptidos encontrados en los análisis de amino-terminal y MS para los alérgenos principales de sandía.

3. Purificación de proteínas alergénicas

Las proteínas alergénicas presentes en el extracto de sandía fueron purificadas mediante diferentes pasos cromatográficos utilizando un sistema AKTAPurifier (GE Healthcare) (esquema 1).



Esquema 1: Pasos cromatográficos empleados para la purificación de la profilina, MDH y TPI a partir de extracto de sandía.

El extracto total de proteínas de sandía fue cargado en la columna de intercambio iónico HiPrep 16/10 DEAE FF (GE Healthcare). Al eluir las proteínas, se obtuvieron, en un rango de molaridad entre 40 y 170 mM de NaCl aproximadamente, las fracciones que contenían la malato deshidrogenasa (MDH), la triosa fosfato isomerasa (TPI) y la profilina (figura 10).

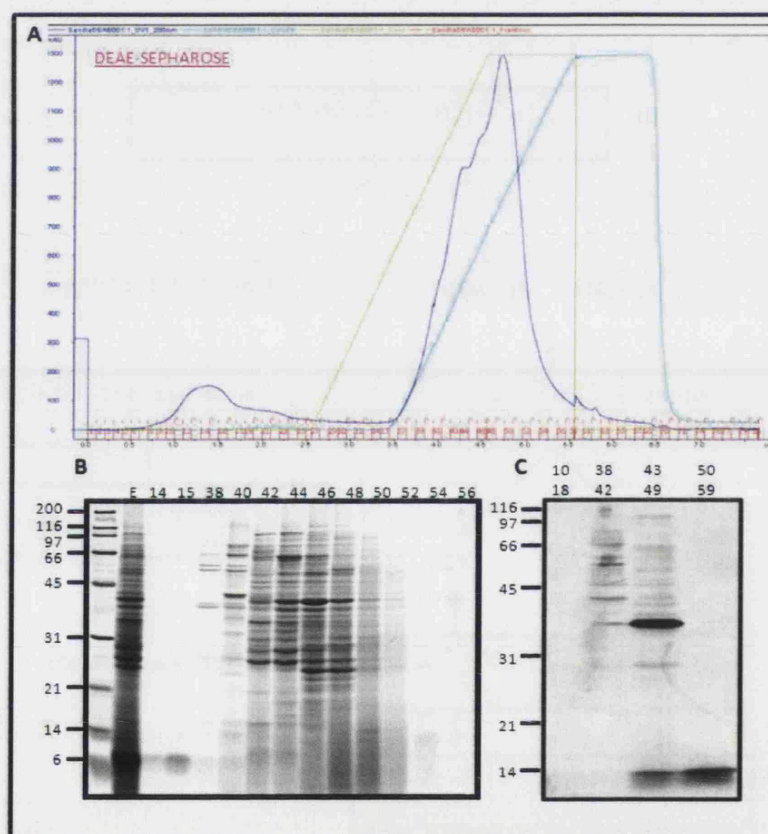


Fig 10: Purificación de tres alérgenos principales de sandía a partir de extracto completo. A: Cromatograma de HiPrep 16/10 DEAE FF. Se representan la A_{280} (azul oscuro), la concentración de tampón de elución (verde) y el porcentaje de conductividad (azul claro). B: PAGE-SDS de las proteínas eluidas. C: Inmunodetección de las fracciones incubadas con una mezcla de sueros de pacientes. En la parte superior se indica el número de fracción o mezcla de fracciones. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Para purificar la TPI y la MDH se utilizó la columna de cromatografía de penetrabilidad Superdex 75 10/300 (GE Healthcare), gracias a la cual se consiguieron separar la MDH y la TPI en dos fracciones diferentes (figura 11).

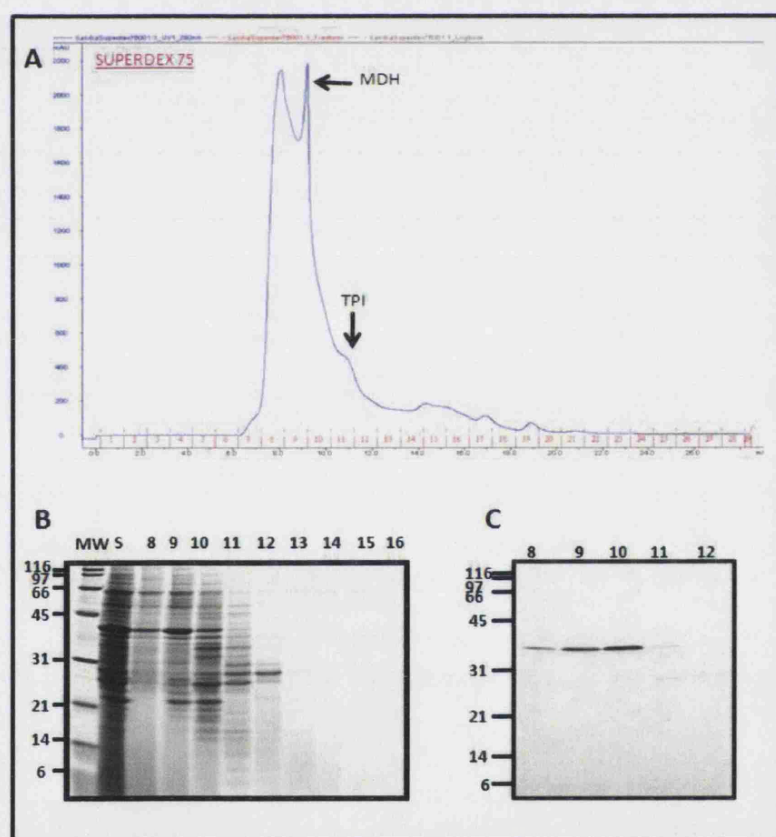


Fig 11: Purificación de MDH y TPI. A: Cromatograma de Superdex 75 10/300 GL. Se representan la A₂₈₀ (azul oscuro). B: PAGE-SDS de las proteínas presentes en las fracciones de elución. C: Inmunodetección de las fracciones incubadas con una mezcla de sueros de pacientes. En la parte superior se indica el número de fracción. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Para acabar de purificar estas dos proteínas fueron necesarios otros dos pasos cromatográficos: primero se usó una columna de intercambio iónico, la Mono-Q 5/50 GL (GE Healthcare), y después la columna de interacción hidrofóbica Source 15PHE 4.6/100 PE (GE Healthcare).

La MDH se eluyó en la Mono-Q 5/50 GL en diferentes fracciones (figura 12) un pico a aproximadamente 20mM de NaCl y otro se obtuvo entre 70 y 150 mM de NaCl. Esto se debe a que posiblemente correspondan a diferentes isoformas de la proteína.

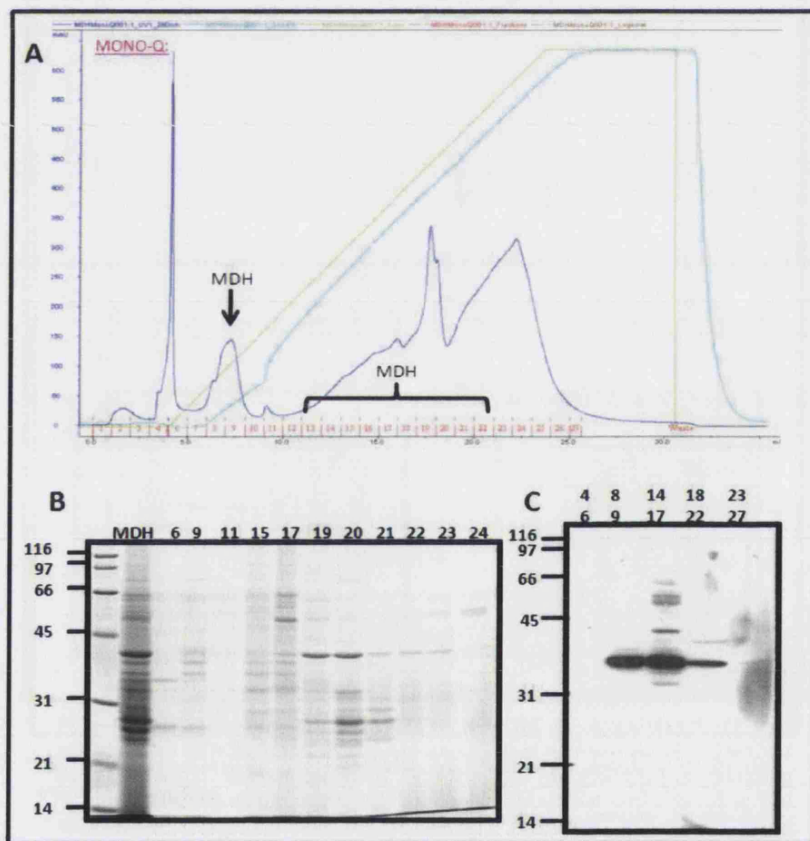


Fig 12: Purificación de MDH. A: Cromatograma de Mono Q 5/50 GL. Se representan la A_{280} (azul oscuro), la concentración de tampón de elución (verde) y el porcentaje de conductividad (azul claro). B: PAGE-SDS de las proteínas presentes en las fracciones de elución. C: Inmunodetección de las fracciones incubadas con una mezcla de sueros de pacientes. En la parte superior se indica el número de fracción o mezcla de fracciones. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los gels o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

En la columna de interacción hidrofóbica, esta proteína se obtuvo cuando la molaridad de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ era menor de 100 mM (figura 13).

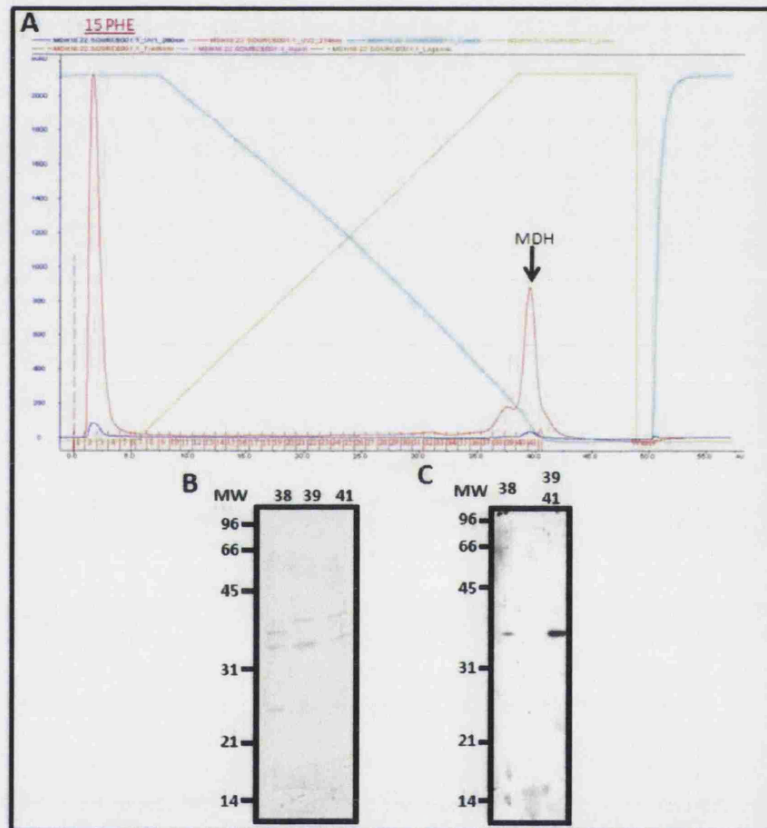


Fig 13: Purificación de MDH. A: Cromatograma obtenido sobre la columna de cromatografía hidrofóbica 15PHE 4.6/100 PE. Se representan la A_{214} (rojo), la concentración de tampón de elución (verde) y el porcentaje de conductividad (azul claro). B: PAGE-SDS de las proteínas presentes en las fracciones de elución. C: Inmunodetección de las fracciones incubadas con una mezcla de sueros de pacientes. En la parte superior se indica el número de fracción o mezcla de fracciones. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

En el caso de la purificación de la TPI, al cargar las fracciones correspondientes en la Mono-Q 5/50 GL, la TPI se obtuvo, aun sin purificar por completo, a una molaridad 25 mM NaCl de (figura 14).

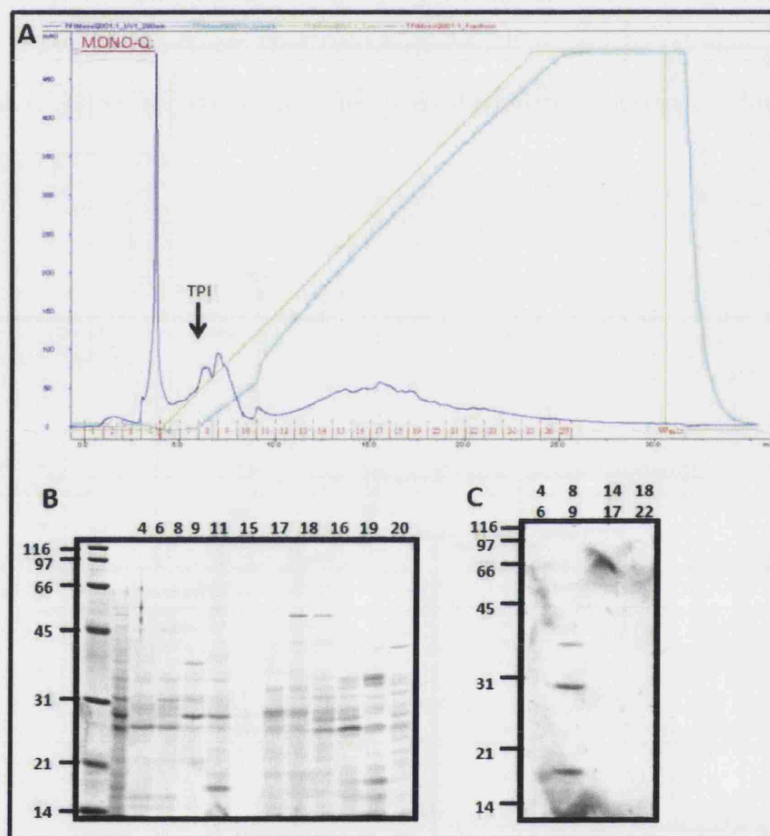


Fig 14: Purificación de TPI. A: Cromatograma de Mono Q 5/50 GL. Se representan la A_{280} (azul oscuro), la concentración de tampón de elución (verde) y el porcentaje de conductividad (azul claro). B: PAGE-SDS de las proteínas presentes en las fracciones de elución. C: Inmunodetección de las fracciones incubadas con una mezcla de sueros de pacientes. En la parte superior se indica el número de fracción o mezcla de fracciones. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los gels o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Finalmente, al utilizar la columna cromatografía que separa las proteínas en base a la hidrofobicidad, el pico correspondiente a la TPI completamente purificada se obtuvo a aproximadamente 130 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (figura 15).

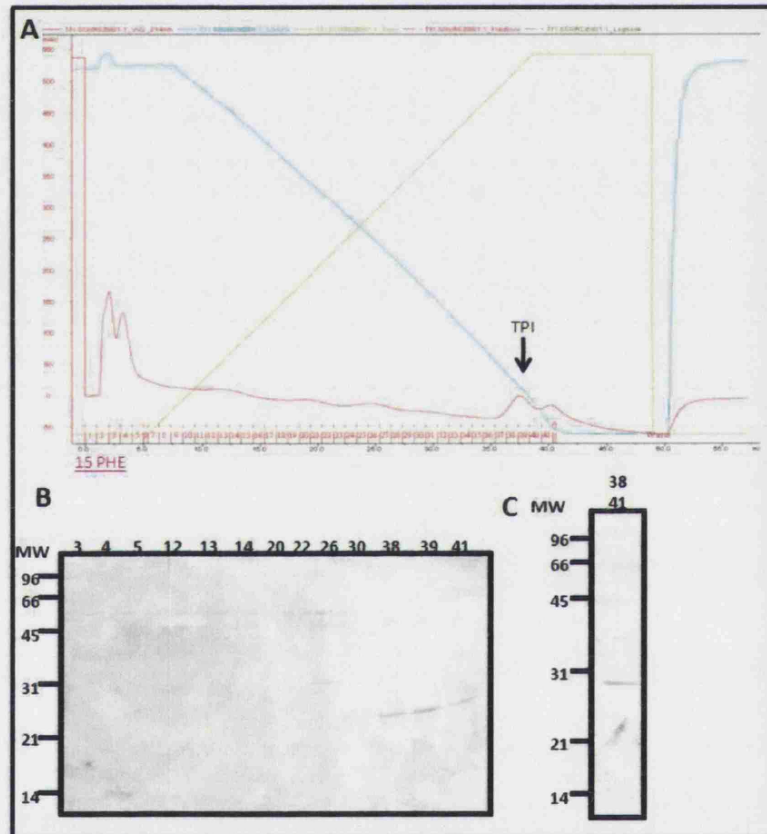


Fig 15: Purificación de TPI. A: Cromatograma obtenido sobre la columna de cromatografía hidrofóbica 15PHE 4.6/100 PE. Se representan la A_{214} (rojo), la concentración de tampón de elución (verde) y el porcentaje de conductividad (azul claro). B: PAGE-SDS de las proteínas presentes en las fracciones de elución. C: Inmunodetección de las fracciones incubadas con una mezcla de sueros de pacientes. En la parte superior se indica el número de fracción o mezcla de fracciones. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Para purificar la profilina a partir de las fracciones obtenidas al eluir la columna de cromatografía DEAE (figura 10) se utilizó en la columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) donde la profilina eluyó en un pico (figura 16).

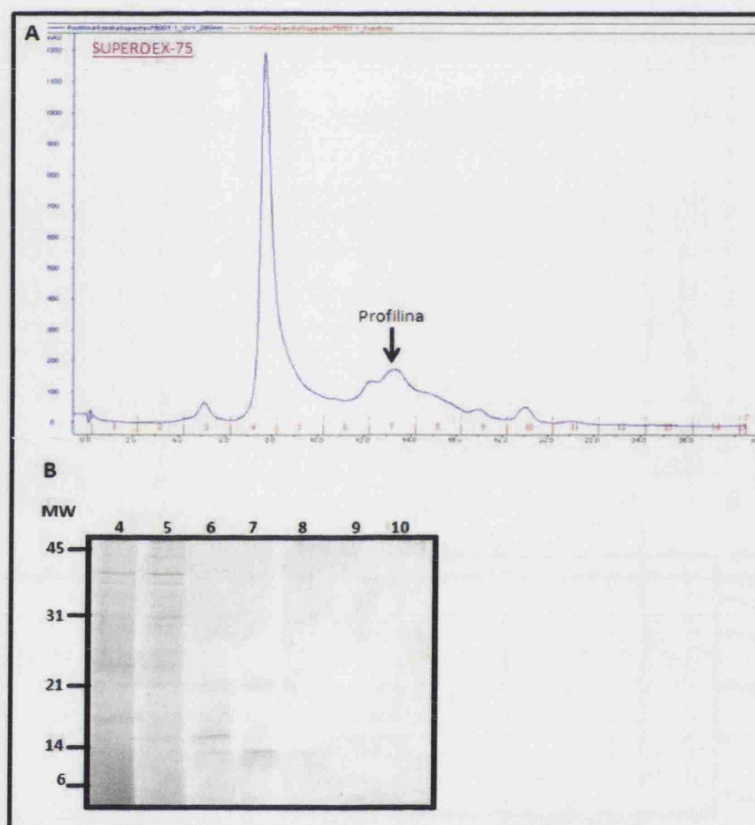


Fig 16: Purificación de profilina natural. A: Cromatograma obtenido para la columna Superdex 75 10/300 GL. Se representa la A_{280} (azul oscuro). B: PAGE-SDS de las proteínas eluidas. En la parte superior se indica el número de fracción. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa

Las fracciones correspondientes al pico de la profilina eluída en la columna de cromatografía de penetrabilidad se recogieron y fueron dializadas frente al tampón de la Mono-Q 5/50 GL. Tras cargarlas en esta columna, la profilina de sandía se obtuvo completamente purificada a una molaridad aproximada de 60 mM de NaCl (figura 17).

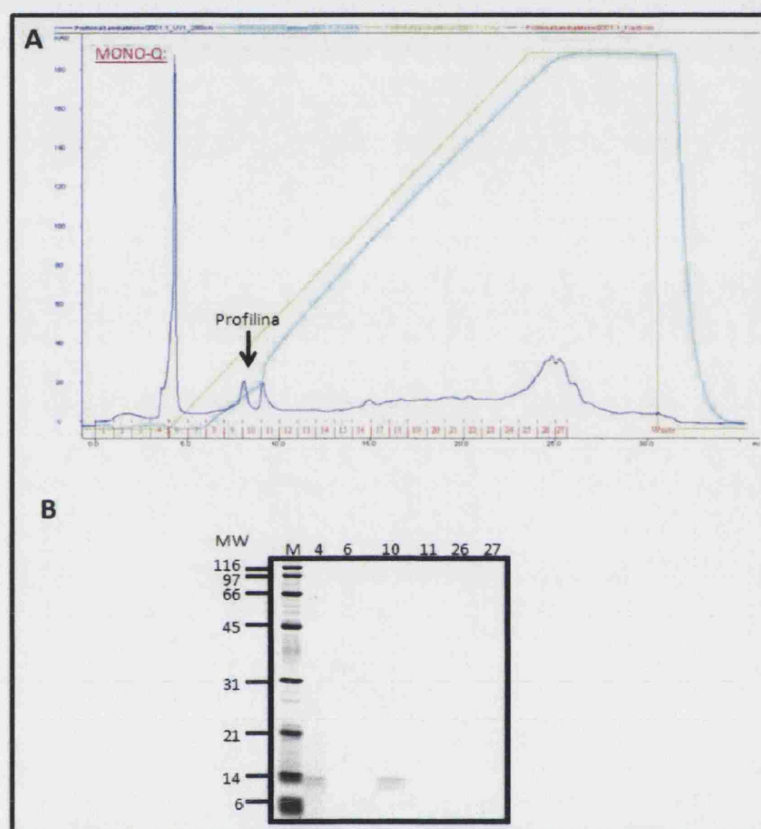


Fig 17: Purificación de profilina natural A: Cromatograma de Mono-Q 5/50 GL. Se representan la A_{280} (azul oscuro), la concentración de tampón de elución (verde) y el porcentaje de conductividad (azul claro). B: PAGE-SDS de las proteínas eluidas. En la parte superior se indica el número de fracción. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Como puede observarse en la figura 18, la profilina y la TPI fueron completamente purificadas. En el caso de la MDH se observa un contaminante de naturaleza proteica con una masa molecular de aproximadamente 40 kDa que, según se comprobó mediante inmunoensayos, no presentaba capacidad de unir IgEs de los sueros de los pacientes, por lo que su presencia no interfiere en los ensayos realizados con la MDH purificada.

Las proteínas purificadas se analizaron por espectrometría de masas para identificarlas y comprobar así que se trataba de la TPI, MDH y profilina.

Por último, con el fin doble de comprobar la especificidad de la unión de las proteínas purificadas a las IgEs, así como su correcta purificación, se

realizaron ensayos de inhibición, incubándolas previamente con los sueros de los pacientes (figura 18).

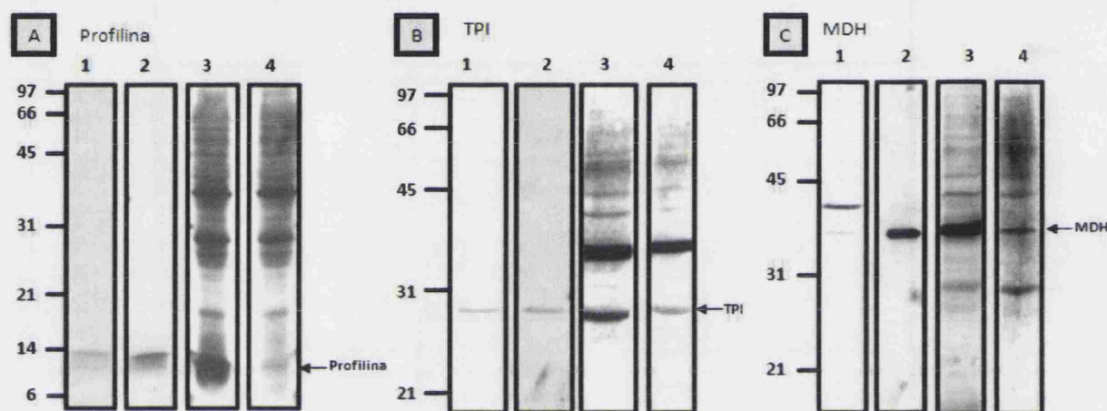


Fig. 18: Ensayos de inhibición con las tres proteínas alergénicas del extracto de sandía. El cuadro A se refiere a la profilina, el B, a la TPI y el C a la MDH. En las calles 1 se observan las proteínas purificadas en un SDS-PAGE teñido con Coomassie coloidal. En los carriles 2, se observan las inmunodetecciones de las proteínas purificadas incubadas con un pool de sueros de pacientes. Los carriles 3 corresponden a una inmunodetección de las proteínas de sandía realizadas con un pool de sueros de pacientes alérgicos y los carriles 4 a inmunodetecciones con los sueros de pacientes inhibidos con las proteínas correspondientes. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

4. Susceptibilidad de los alérgenos de sandía a la pepsina

El efecto producido por el tratamiento del extracto de sandía con la enzima gástrica pepsina puede observarse en la figura 19. Todas las bandas proteicas presentes en dicho extracto fueron degradadas a pequeños fragmentos peptídicos de baja masa molecular, siendo únicamente detectables en el SDS-PAGE las bandas correspondientes a la pepsina. Los mismos resultados se obtuvieron en el inmunoensayo, donde las bandas correspondientes a la MDH, TPI y Profilina, así como el resto de alérgenos, desaparecen ya a los 5 minutos de tratamiento, lo que indica su gran susceptibilidad a esta enzima digestiva.

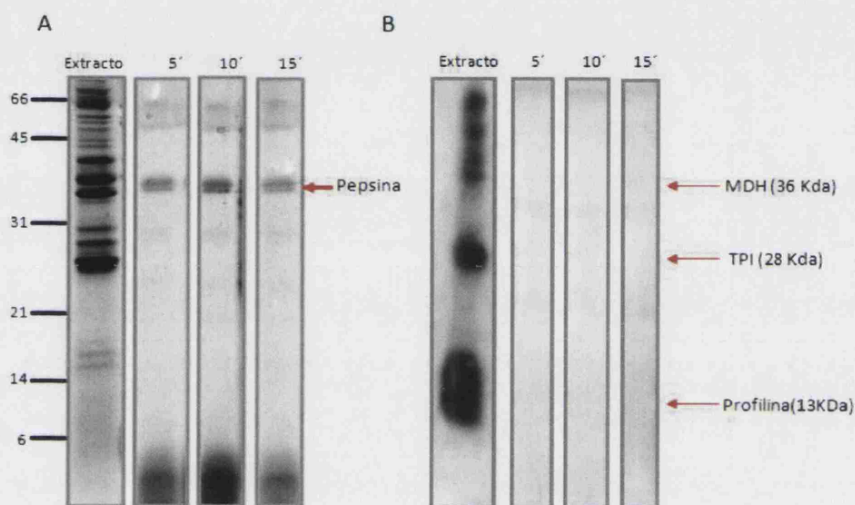


Fig. 19: Análisis mediante SDS-PAGE e inmunodetección del extracto de sandía digerido con pepsina. A: Tinción de Coomassie. B: Inmunodetección con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a sandía, realizada a 5, 10 y 15 minutos de incubación del extracto de sandía con pepsina. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

5. Purificación de profilina con Sepharose poly-prolina

La profilina presente en el extracto de sandía también se purificó mediante un protocolo basado en una cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Sepharose activada con bromuro de cianógeno, a la que se le habían unido covalentemente residuos de poly-prolina, con los que reacciona la profilina.

La unión entre las profilinas, o los complejos actina-profilina, a los grupos amino de los ligandos es reversible mediante la adición de tampón B y tampón C, eluyendo los complejos actina-profilina con el primero y la profilina con el segundo. Debido al elevado porcentaje de urea del tampón de elución de las

profilinas (tampón C), es necesario un paso de diálisis del eluido frente a 0.1M de bicarbonato amónico, con el fin de reducir la cantidad de sales presente.

El rendimiento de la purificación obtenido fue aproximadamente de un 0.15%, con respecto a la pulpa, recuperando aproximadamente 141 μ g de profilina natural a partir de 100 g de pulpa. El rendimiento obtenido respecto al extracto proteico, fue cercano al 1%, recuperándose aproximadamente 425 μ g de nProfilina de los 40 mg de proteína total cargados en la columna de afinidad.

La profilina, una vez purificada, siguió siendo reconocida de forma específica por la IgE de los pacientes y la IgG presentes en el suero de conejo inmunizado con esta proteína (anticuerpo cedido por Bial Arístegui), como se puede observar en los inmunoensayos realizados con suero de pacientes y con anticuerpos policlonales (figura 20).

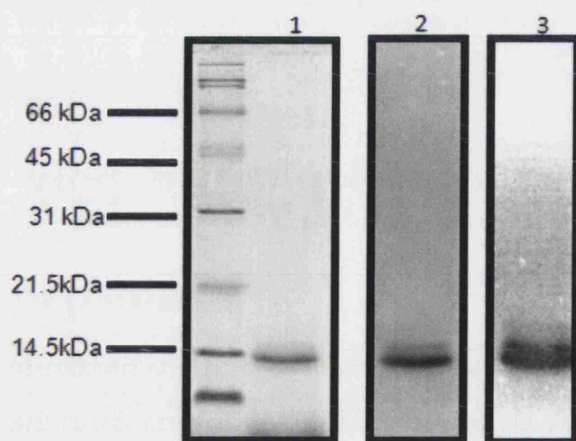


Fig. 20: Análisis mediante SDS-PAGE e inmunodetección de la purificación de profilina natural por el método de cromatografía de afinidad a poly-prolina. Carril 1: SDS-PAGE (12.5%) del eluido con tampón C. Carril 2: Inmunodetección con sueros de pacientes alérgicos a profilina. Carril 3: Inmunodetección con un anticuerpo policlonal de conejo anti profilina (Bial Arístegui). Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

La profilina purificada fue analizada por análisis de MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight), para comprobar la masa molecular de la proteína purificada (figura 21). En la figura se puede observar un pico a 14095 Da, que corresponde con la masa molecular teórica de la profilina.

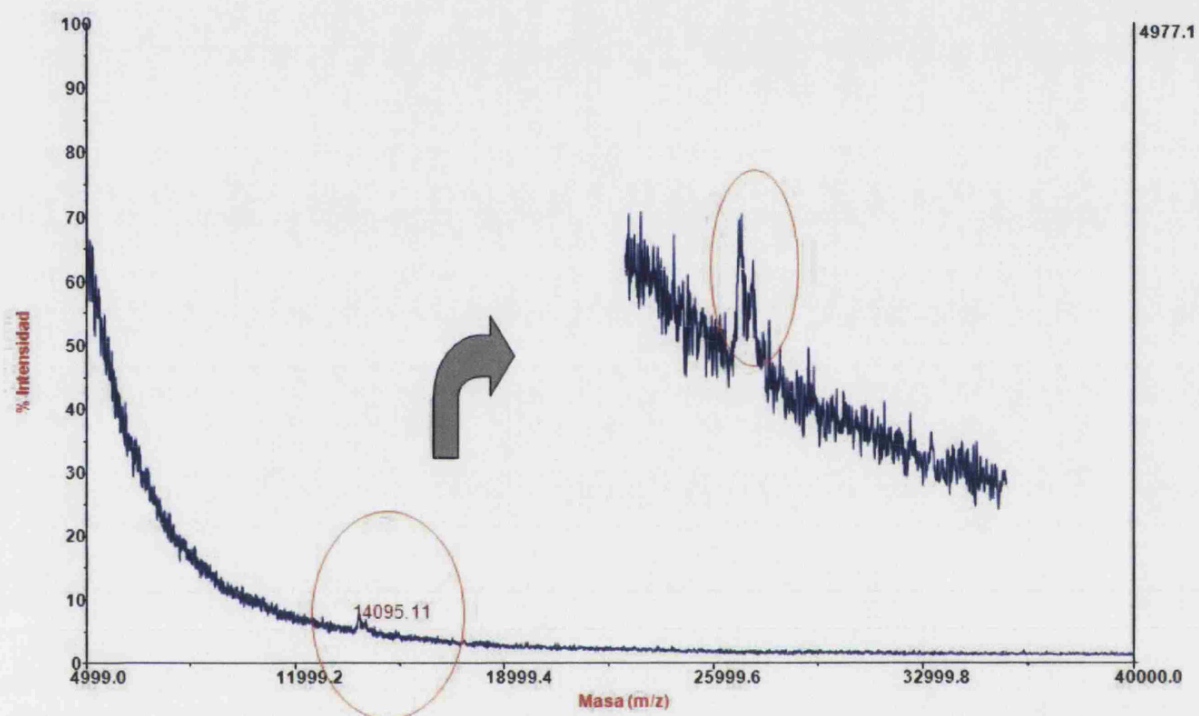


Fig. 21: Análisis de MALDI-TOF de la profilina natural de sandía.

Clonaje y secuenciación del cADN codificante de rProfilina

La secuencia de nucleótidos que codifica la profilina recombinante está constituida por 393 nucleótidos (figura 22), que corresponden a una secuencia de 131 aminoácidos. Dicha secuencia fue depositada en el "Gen Bank", con número de acceso GI: 52352488).

1	Atg	tcg	tgg	cag	gcg	tat	gtc	gat	gat	cat	ttg	atg	tgc	gaa	att	gag	
	M	S	W	Q	A	Y	V	D	D	H	L	M	C	E	I	E	
49	Ggc	aat	cac	ctc	aca	tct	gcg	gcc	att	atc	ggc	caa	gac	ggc	agt	gtt	
	G	N	H	L	T	S	A	A	I	I	G	Q	D	G	S	V	
97	Tgg	gct	aaa	agc	gaa	aat	ttc	cct	cag	ctc	aag	cct	gaa	gaa	att	act	
	W	A	K	S	E	N	F	P	Q	L	K	P	E	E	I	T	
145	Ggc	atc	ttg	aat	gac	ttc	aat	gaa	ccc	ggg	acg	ctt	gct	ccg	act	ggt	
	G	I	L	N	D	F	N	E	P	G	T	L	A	P	T	G	
193	Ttg	tac	att	ggt	ggt	tca	aaa	tat	atg	gta	atc	caa	ggg	gag	cct	gga	
	L	Y	I	G	G	S	K	Y	M	V	I	Q	G	E	P	G	
241	Gct	gtt	att	cgt	ggg	aag	aag	ggc	cca	ggt	ggg	gtt	act	gtt	aag	aag	
	A	V	I	R	G	K	K	G	P	G	G	V	T	V	K	K	
289	Act	gct	ctg	gct	tta	gtc	att	ggc	atc	tat	gat	gaa	cca	atg	act	cct	
	T	A	L	A	L	V	I	G	I	Y	D	E	P	M	T	P	
337	Ggt	cag	tgc	aat	atg	att	gtt	gaa	agg	ctt	ggg	gat	tac	ctt	atc	gag	
	G	Q	C	N	M	I	V	E	R	L	G	D	Y	L	I	E	
385	Cag	ggc	ctc														
	Q	G	L														

Figura 22. Secuencia de nucleótidos de rProfilina junto con la de aminoácidos deducida teóricamente. En color verde se encuentran marcados los péptidos identificados en el análisis de MS-MS.

1. Purificación de profilina recombinante

Para la expresión de rProfilina se utilizaron los medios de cultivo BMGY y BMMY, de crecimiento e inducción, respectivamente. El tiempo óptimo de inducción establecido para la producción de profilina recombinante fue de 48 horas.

Por cada litro de medio BMGY inoculado con *P. pastoris* transformada con el vector pPICZ α A conteniendo la secuencia de la profilina recombinante, se obtuvieron 2 mg de profilina recombinante purificada.

Se realizaron análisis mediante PAGE-SDS e inmunoensayos con una mezcla de sueros de pacientes y con el antisuero de conejo anti-profilina (figura 23), observándose tres bandas proteicas, con masas moleculares de 16852,80; 17058,28 y 17255,54 kDa, que fueron identificadas como profilina mediante análisis de MALDI-TOF (figura 24).

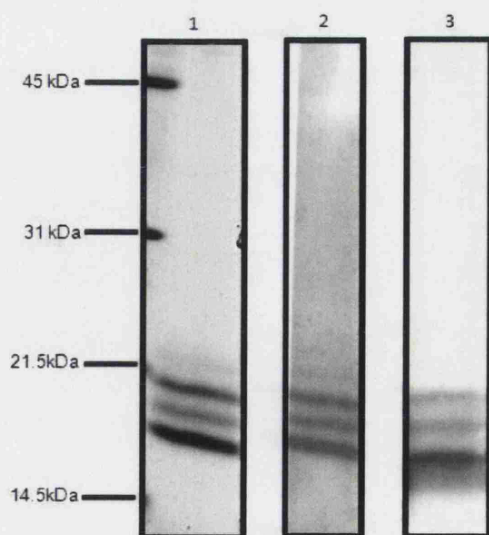


Figura 23: Panel 1: Análisis mediante SDS-PAGE de la profilina recombinante de sandía. Panel 2: Análisis mediante inmunodetección de la profilina recombinante de sandía con sueros de pacientes. Panel 3: Análisis mediante inmunodetección de la profilina recombinante de sandía con anticuerpo policlonal anti-profilina recombinante. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

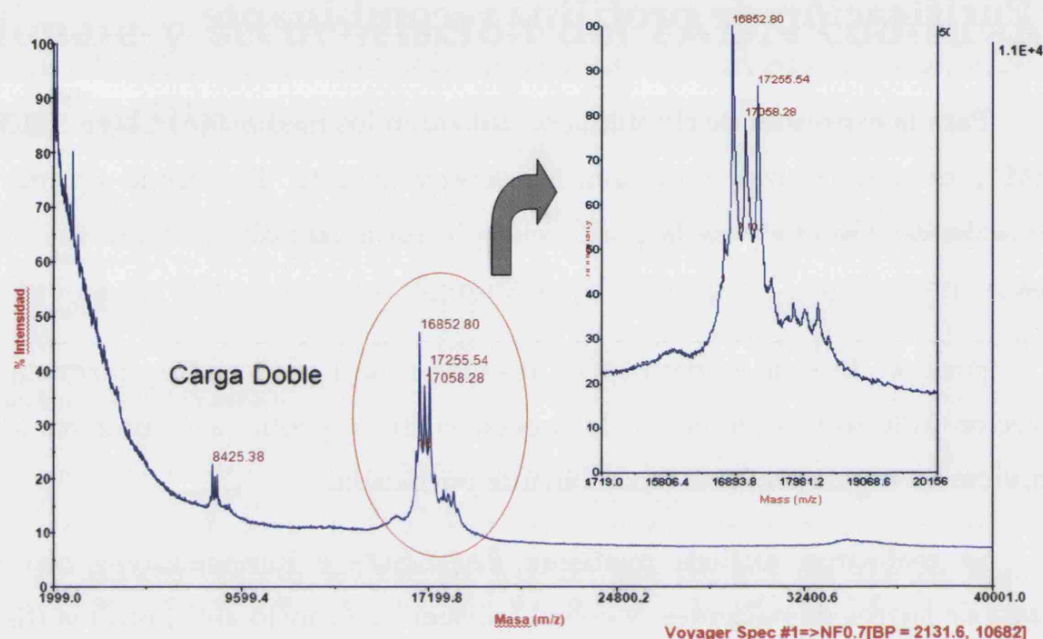


Figura 24: Análisis de MALDI-TOF de la profilina recombinante de sandía.

2. Detección de profilina recombinante

Con el fin de comprobar la expresión de la profilina recombinante, se utilizaron dos métodos basados en anticuerpos monoclonales específicos para determinadas secuencias incluídas en la proteína recombinante de fusión: Anti-*myc*-HRP y anti-His(C-term), ambos de Invitrogen.

En ambos casos se obtuvieron resultados positivos que confirman la expresión de la profilina recombinante (figura 25).

Para comprobar por otro método que efectivamente se trataba de una proteína expresada se realizó la tinción específica de las proteínas de fusión con cola de histidinas, realizada utilizando el reactivo comercial InVision His-Tag In-gel Stain (Invitrogen). También se observaron tres bandas fluorescentes correspondientes a la rProfilina (figura 25), lo que concordaba con los resultados obtenidos anteriormente.

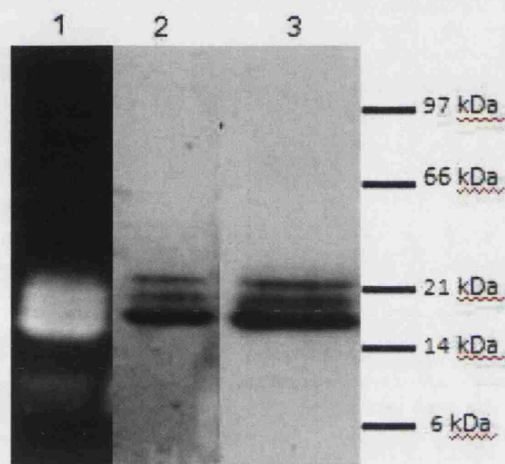


Figura 25: Detección de profilina recombinante mediante PAGE-SDS e inmunodetección utilizando distintos métodos: Profilina recombinante (3 µg) incubada con In-Vision HIS-TAG staining (carril 1) con Anti-His (C-term) 1:1000 y GAM/PO 1:2500 (carril 2) y anti-myc-HRP 1:500 (carril 3). Las masas moleculares de los marcadores se indican a la derecha de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Similitud entre profilinas

Existe una elevada similitud entre las secuencias de las profilinas procedentes tanto de alimentos de origen vegetal, como de pólenes, como se puede observar en las inmunodetecciones realizadas utilizando el anticuerpo policlonal anti-profilina recombinante de sandía producido en el laboratorio, tanto con extractos completos como con las profilinas de diferentes especies (figura 26).

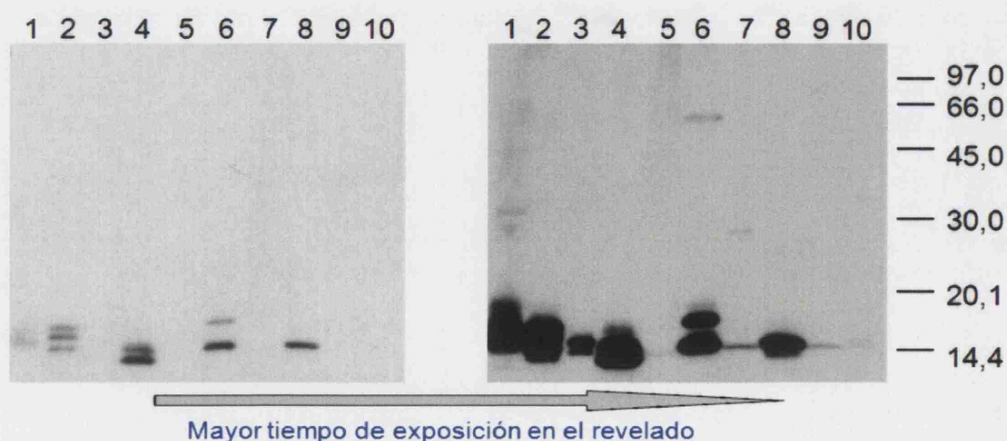


Fig. 26: Inmunodetección (anti-profilina 1:100.000) de profilina de diferentes fuentes naturales. 1: Extracto polen de *Lolium perenne*. 2: Extracto de polen de *Olea europea*. 3: Extracto polen de *Artemisia vulgaris*. 4: Extracto de *Platanus acerifolia*. 5: Extracto de polen de *Parietaria judaica*. 6: Extracto de polen de *Salsola kali*. 7: Extracto de melón (pulpa). 8: Extracto de naranja (pulpa). 9: Extracto de cereza (pulpa). 10: Extracto de pera (pulpa). Los marcadores de masa molecular aparecen a la derecha (kDa).

En la figura 27 se puede observar la secuencia de la profilina de sandía y el alineamiento con las secuencias de profilinas de otras fuentes vegetales, entre las que existe un porcentaje de similitud mayor al 70%, refiriéndose en la figura como identidad al porcentaje de aminoácidos idénticos y como positividad al porcentaje de aminoácidos idénticos más los aminoácidos equivalentes, por ejemplo valina y leucina.

<u>Citrullus lanatus</u>	MSWQAYVDDHLMCEIEGNNILTSAAIIGQDGSVWAKSENFPQLKPEEITGILNDFNEPGL 60
Cuc m 2	-----D-D--R--A--L-----SQ-AT--A-R---AA--K--DQ----
Mal d 4.0201	-----SA-----HN-----Q-AT-----V--M-----S-
Pru p 4.02,	-----SA-----H-----Q-AT-----S-
Phl p 12	-----YE-----SH--S--L-H--T--Q-TA--F-----MK-D--H-
Fra a 4	-----T-----SA-----Q-AT-----V--VR--D----
<u>Citrullus lanatus</u>	MSWQAYVDDHLMCEIEGNNILTS--AAIIGQDGSVWAKSENFPQLKPEEITGILNDFNEPG 58
Bet v 2	-----T--E-----D-D-QASN-LAS--V-H-----Q-SS--F--Q-----MK--E--

<u>Citrullus lanatus</u>	APTGLYIGGSKYMVIQGEFGAVIRGKKGPGGVTVKKTALALVIGIYDEPMTFGQCHMIVE 120
Cuc m 2	-----FL--T-----A-----S--I-----N--I-----L-----
Mal d 4.0201	-----L--T-----V-----STM--L-----V--
Pru p 4.02,	-----L--T-----V-----ST--L-----
Phl p 12	-----HL--T-----A-I-----GQ-IF-----L-----I--
Fra a 4	-----L--T-----T--L-----
<u>Citrullus lanatus</u>	TLAPTGLYIGGSKYMVIQGEFGAVIRGKKGPGGVTVKKTALALVIGIYDEPMTFGQCHMI 118
Bet v 2	H-----HL--I-----A-----S--I-I--GQ--F--E--V-----V

<u>Citrullus lanatus</u>	RLGDYLIEQGL 131	Identity (%)	Positive identity (%)	Gaps (%)
Cuc m 2	-----	78%	90%	0%
Mal d 4.0201	-----	86%	96%	0%
Pru p 4.02,	-----V--	89%	96%	0%
Phl p 12	-----VK--	77%	90%	0%
Fra a 4	-----V--	88%	96%	0%
<u>Citrullus lanatus</u>	VERLGDYLIEQGL 133	-	-	-
Bet v 2	-----D--	72%	85%	1%

Figura 27: Alineamiento utilizando el programa blast del servidor Expasy (www.expasy.ch) de las secuencias de aminoácidos, deducidas a partir de los cADNs, de diferentes profilinas procedentes del reino vegetal (Números de acceso: *Citrullus lanatus* AY730591; *Cucumis melo*, Cuc m 2 CAD92666; *Fragaria ananassa*, Fra a 4 P0C0Y3; *Prunus dulcis* x *Prunus persica* ACE80973) y pólenes (Números de acceso: *Malus domestica*, mal d 4.0201 Q9XF41; *Betula verrucosa*, Bet v 2M64179; *Plheum pratense*, Phl p 12 O24650). Únicamente se señalan las diferencias respecto a la secuencia de la profilina de sandía (*Citrullus lanatus*).

1. Equivalencia inmunológica de rProfilina y nProfilina

Para comparar la respuesta inmunológica de ambas profilinas, nProfilina y rProfilina, fue de gran utilidad la producción del anticuerpo policlonal. El antisuero obtenido, conteniendo las IgGs específicas anti-profilina, se utilizó para realizar pruebas de inmunodetección y ELISA.

1.1. Reconocimiento de rProfilina y nProfilina por la IgG del antisuero de conejo

El anticuerpo policlonal anti-profilina fue capaz de reconocer la rProfilina y la nProfilina purificadas (figura 20, figura 23, carriles 3), así como también la nProfilina presente en el extracto completo de sandía (figura 28, carril 5). En todos los casos el reconocimiento del anticuerpo fue de gran sensibilidad, estableciéndose mediante técnicas de inmunodetección, una dilución óptima para su uso de 1:70.000 en 1.5% leche desnatada en PBS-T 0.05% (figura 28).

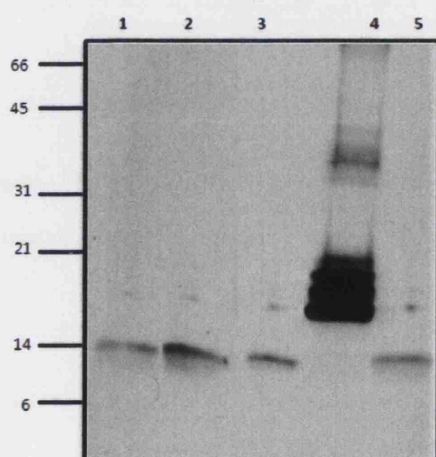


Figura 28: Inmunodetección de profilina por la IgG de suero policlonal. 1) 30 µg de extracto de sandía incubado con antisuero anti-Profilina 1:100.000. 2) 30 µg de extracto de sandía incubado con antisuero anti-Profilina 1:50.000. 3) 30 µg de extracto de sandía incubado con antisuero anti-Profilina 1:70.000. 4) 5,5 µg de rProfilina incubado con antisuero anti-Profilina 1:70.000. 5) 10 µg de nProfilina incubado con antisuero anti-Profilina 1:70.000. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

También se realizó una titulación del anticuerpo mediante ELISA (figura 29), utilizando profilina natural y recombinante y BSA como control negativo. El resultado confirma el obtenido anteriormente en el inmunoensayo, dando como diluciones óptimas aquellas comprendidas entre 1:50.000 y 1:100.000.

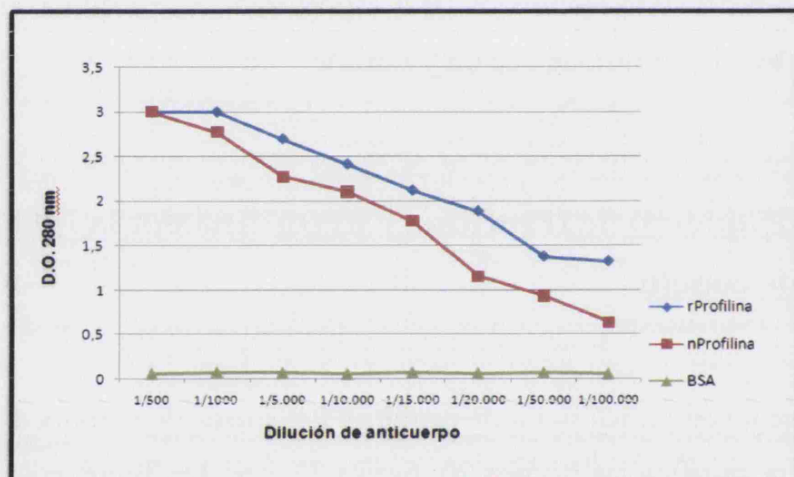


Figura 29: Titulación en ELISA de la unión del anticuerpo policlonal anti-profilina a profilina natural y recombinante. Control negativo: BSA.

1.2. Reconocimiento de rProfilina y nProfilina por las IgEs de los sueros de los pacientes

Para evaluar la sensibilización de los pacientes a la profilina se realizaron ensayos de inhibición en ELISA, tanto con profilina natural como con profilina recombinante, usando como fase sólida la recombinante y la natural, respectivamente, obteniéndose un coeficiente de correlación muy elevado ($R^2=0.927$) entre los valores obtenidos para la IgE específica anti nProfilina y la IgE anti rProfilina utilizando el estadístico de Pearson (figura 30).

En los ELISAs de inhibición que se llevaron a cabo con extracto de sandía

y preincubando los sueros de los pacientes con diferentes concentraciones de ambas profilinas purificadas, natural y recombinante, se puede observar que los resultados son muy similares entre sí, lo que significa que la IgE presente en los sueros muestra una reactividad muy parecida ante la forma natural y recombinante de la profilina (figura 31 A).

Por otro lado, se realizaron ELISAs de inhibición con las profilinas purificadas (figura 31 B), demostrando que tanto la nProfilina como rProfilina pueden inhibirse la una a la otra: La nProfilina es capaz de inhibir a la rProfilina completamente y esta inhibe a la primera en más de un 70%. En los controles negativos, utilizando una mezcla de 5 sueros de pacientes no alérgicos, no se observó reactividad alguna frente al extracto de sandía o las profilinas.

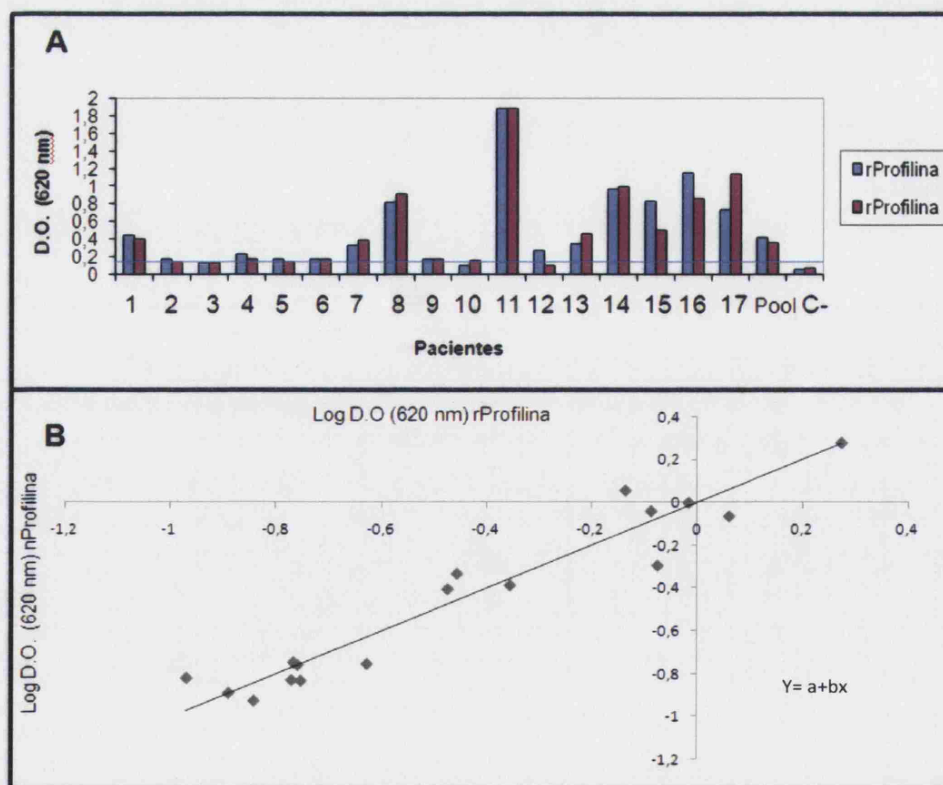
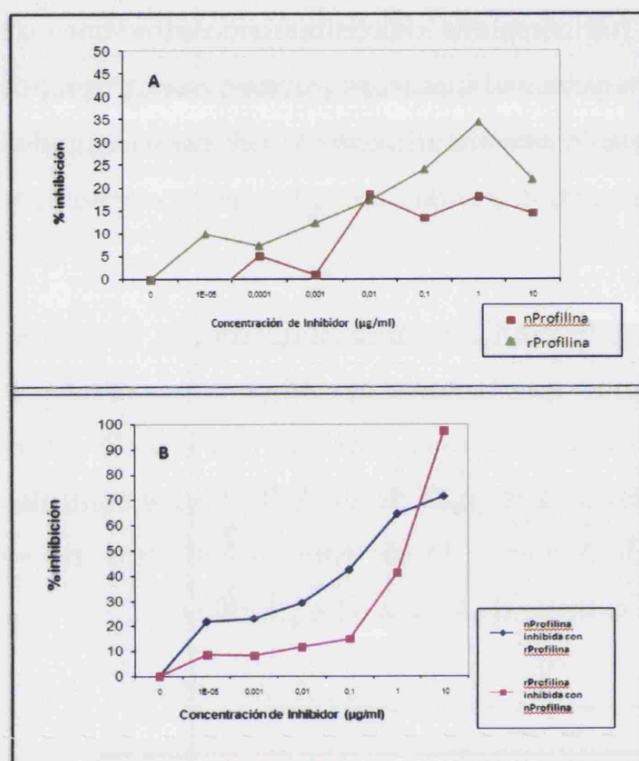
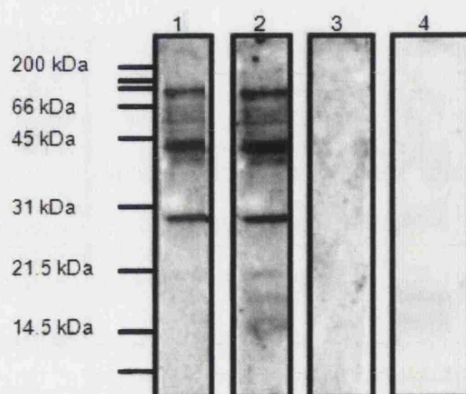


Figura 30: A) Análisis mediante ELISA de la reactividad de las IgEs presentes en los sueros de pacientes con alergia a sandía. Fueron considerados positivos los valores de D.O. a 650nm mayores que el doble de lo obtenido para el control negativo (2×0.13). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. B) correlación encontrada entre las profilinas natural y recombinante ($R^2=0.927$).



En los ensayos de inhibición en inmunotransferencia realizados con sueros de pacientes, previamente inhibidos con profilina natural, recombinante y extracto completo de sandía, se confirma la equivalencia inmunológica existente entre ambas formas de profilinas, la recombinante y la nativa (figura 32).



Pruebas de activación de basófilos (Basotest)

Los ensayos de activación de basófilos (Basotest; Orpegen, Pharma) se realizaron con el objetivo de comprobar la actividad biológica de las profilinas natural y recombinante purificadas, para poder descartar la existencia de únicamente unión a IgE sin poseer actividad biológica.

Los experimentos de Basotest se realizaron con concentraciones crecientes de ambas profilinas (natural y recombinante) desde 0.001 μg hasta 50 μg de alérgeno/ml de sangre completa del paciente alérgico a sandía y sensibilizado a profilina.

La respuesta indicó una activación dosis-dependiente para ambas profilinas.

El porcentaje de activación observado al utilizar profilina natural como alérgeno iba desde un 61.42% para 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína, hasta 73.84% para una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con unos valores de 2.94% y 32.22% para los controles negativos y positivos, respectivamente.

En el caso de la profilina recombinante la activación observada se encontraba entre el 54.34% para una concentración de 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el 88.01% para 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En este caso los valores de activación de los controles fue de 54.97% para el control positivo y de 2.11%, para el negativo.

No se observó respuesta alguna en el control negativo, realizado con la sangre de un paciente no atópico.

Determinación de parámetros moleculares de la profilina a partir de predicciones teóricas

La profilina de sandía tiene una masa molecular teórica de 14079.1 Da, que se acerca mucho a 14095.11, obtenida en el análisis de espectrometría de masas. El punto isoeléctrico teórico es 4.66 (tabla 5), según lo calculado en el programa ProtParam (servidor Expasy).

	Número de aminoácidos	Masa Molecular	pI teórico
rProfilina	131	14079.1	4.66

Tabla 5: Resumen de los parámetros moleculares teóricos de la rProfilina calculados con el programa ProtParam, del servidor Expasy. (<http://www.expasy.org>).

La predicción de estructura secundaria de la profilina de sandía se realizó mediante el método de Garnier y col. (1996). Se obtuvo una composición estructural basada fundamentalmente en ordenación aperiódica (57.25 %), aunque también aparece un 33.59% de lámina beta y un 9.16% de estructura en alfa hélice, localizada en la región próxima al carboxilo-terminal (figura 33).

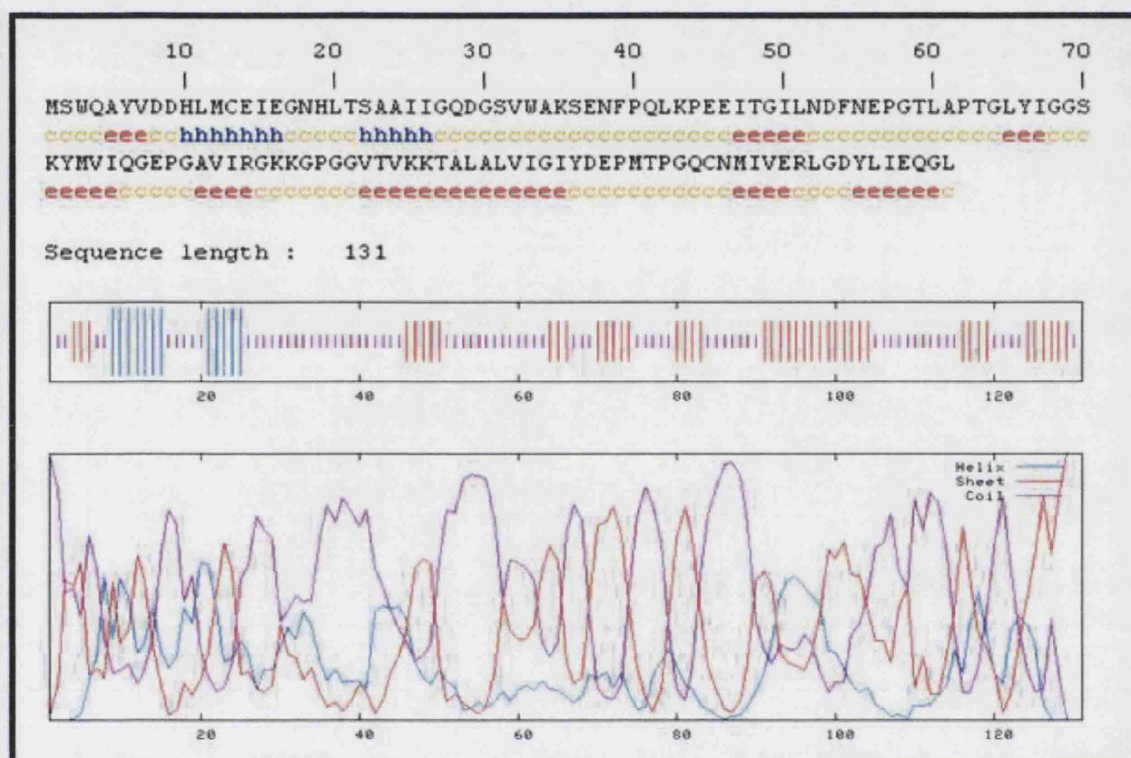


Fig. 33: Predicción de la estructura secundaria de la profilina de sandía según el método descrito por Garnier y col. En amarillo se encuentran representados los aminoácidos con ordenación aperiódica (c), en azul, la alfa hélice (h) y en rojo la lámina beta (e).

Para el modelado de la estructura tridimensional de la profilina de sandía se empleó el programa Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997), basándonos en la estructura de la profilina de *Arabidopsis thaliana* (PDB: 3nula) (figura 34).

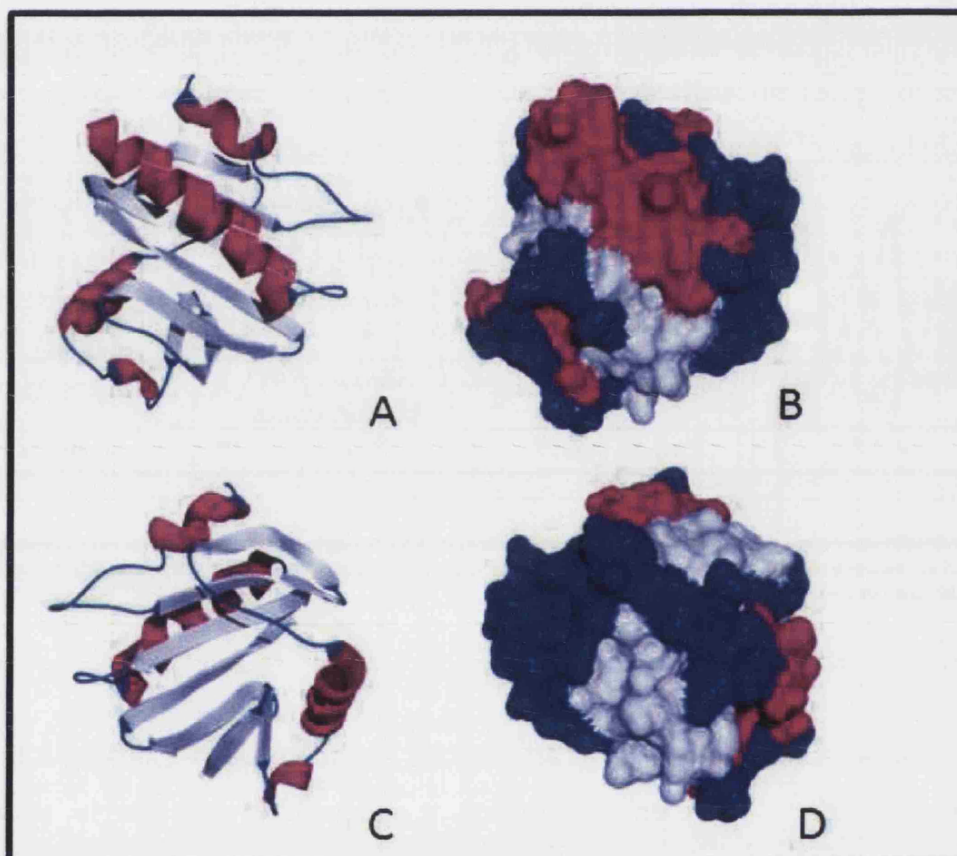


Fig. 34: Modelo teórico de la estructura tridimensional de la profilina de sandía. Se muestra en rosa las estructuras ordenadas en alfa-hélice, en morado las láminas beta y en azul la ordenación aperiódica. A y B son vistas frontales de la proteína y C y D son el resultado de girar el modelo 180°C.

A lo largo de toda la estructura de la profilina se puede observar una combinación de zonas hidrofóbicas e hidrofílicas, según la predicción teórica obtenida por el método de Kyte y Doolittle (figuras 35 A, 36).

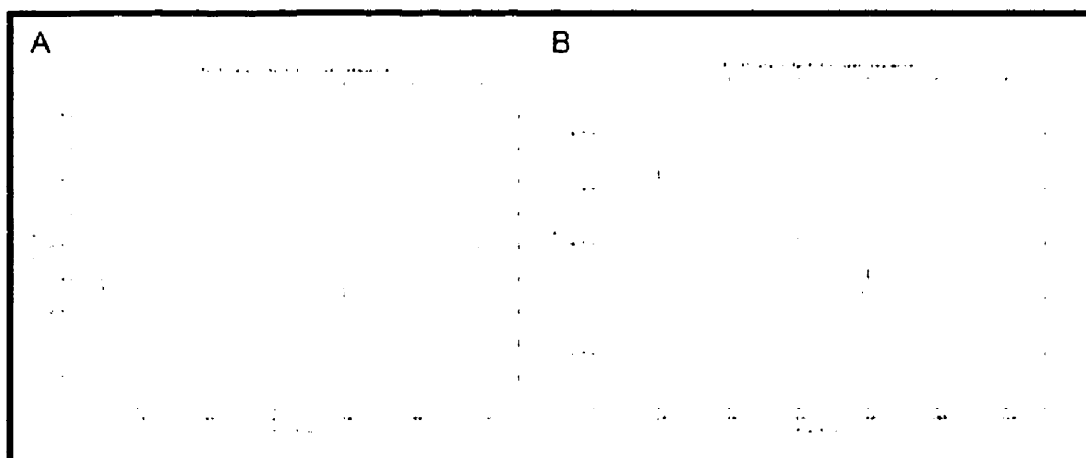


Fig 35: Predicciones teóricas de la hidrofobicidad (A) y antigenicidad de la Profilina de sandía, basadas en los modelos de Kyte y Doolittle (1982) y Welling y col. (1985), respectivamente.

Respecto a la alergenicidad teórica de la profilina, aplicando la predicción de Welling, se pueden determinar 3 regiones con potencial antigénico, comprendidas entre los aminoácidos 6-9, 20 y 94-100 (figuras 35 B, 37).

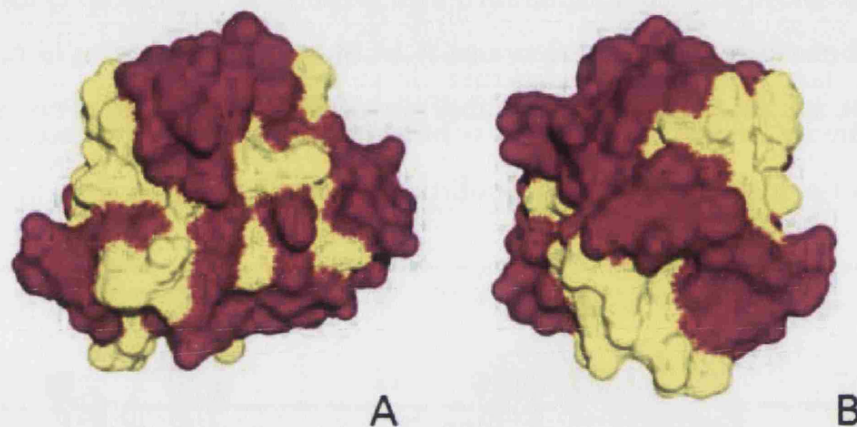


Fig. 36: Modelo teórico de la estructura tridimensional de la profilina de sandía, según Kyte y Doolittle. Se muestra en amarillo los aminoácidos hidrofóbicos. El modelo A es una vista frontal de la proteína y B es el resultado de girar el modelo 180°C.

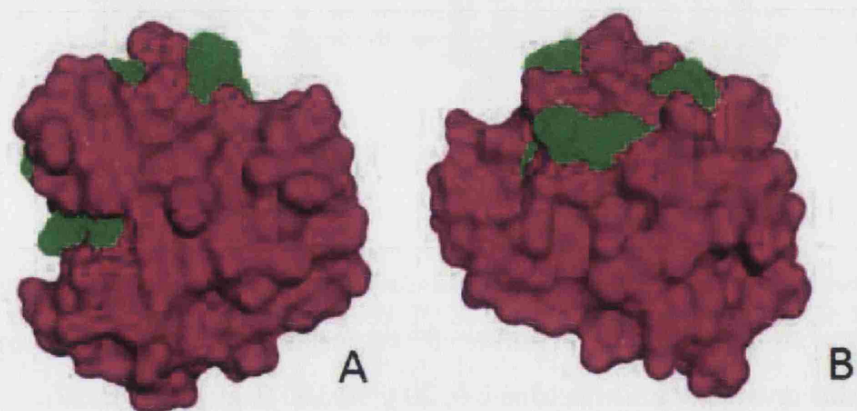


Fig. 37: Modelo teórico de la estructura tridimensional de la profilina de sandía, según Welling y col. (1985). Se muestran en verde los aminoácidos potencialmente alergénicos. El modelo A es una vista frontal de la proteína y B es el resultado de girar el modelo 180°C.

Clonación y secuenciación del cADN codificante de rMDH

1. Expresión de rMDH en *Pichia pastoris*

Para la expresión de rMDH en *Pichia pastoris* se probaron las mismas condiciones que para la expresión de la profilina: medio de crecimiento BMGY y medio de inducción BMMY. Inicialmente se probaron tiempos de inducción de 24 y 48 horas, en las que no se obtuvo expresión de proteína recombinante (figura 38).

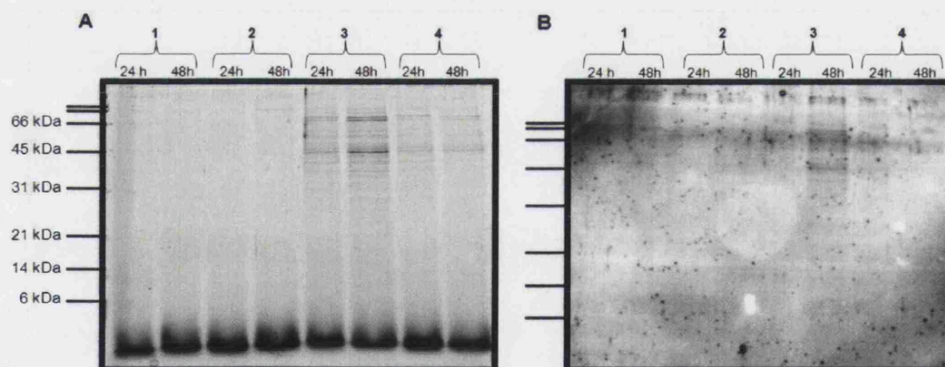


Figura 38: Análisis mediante SDS-PAGE e inmunodetección del sobrenadante de la expresión de rMDH en *Pichia pastoris* a 24 horas y 48 horas utilizando medios BMGY y BMMY: tinción con Coomassie (A) e inmunodetección con suero de pacientes (B). Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Posteriormente se comprobó si se produciría expresión a mayores tiempos de inducción, sin obtenerse tampoco resultados positivos (figura 39).

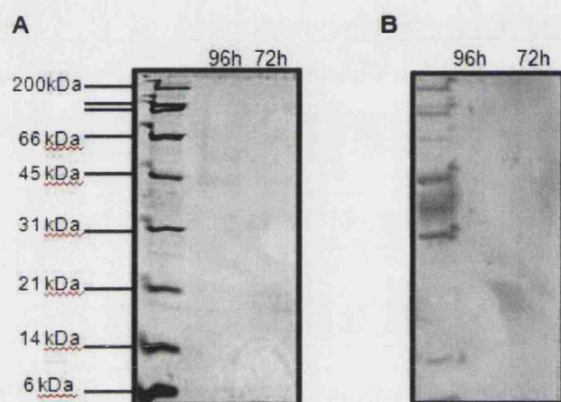


Figura 39: Análisis mediante PAGE-SDS (A) e inmunodetección con suero de pacientes (B) para detectar la expresión de rMDH en *Pichia pastoris* a 72 y 96 horas utilizando medios de cultivo BMGY y BMMY. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Se comprobó que la ausencia de la proteína recombinante en el medio extracelular no se debía a una incorrecta secreción, mediante la lisis de las células y el análisis del contenido intracelular, sin observarse tampoco rMDH en el interior celular (figura 40).

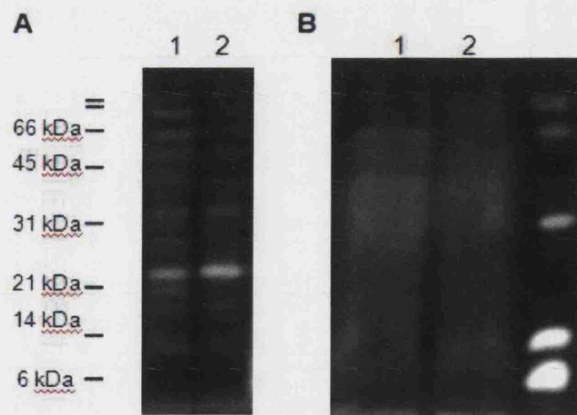


Figura 40: Tinción con Invision His-Tag Stain (Invitrogen) de los sobrenadantes de la expresión de rMDH (A) y de un lisado de las células (B) de dos colonias de *Pichia pastoris* elegidas al azar (1 y 2) a 96 horas utilizando medios de cultivo BMGY y BMMY. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Por último, se comprobó la expresión de rMDH utilizando otros medios de cultivo recomendados por el fabricante para la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia*, concretamente BMGH Y MGYH como medios de crecimiento y BMMH y MMH como medios de inducción (figuras 41 y 42, respectivamente). Se analizaron diferentes bandas proteicas por espectrometría de masas (análisis MS/MS) y ninguna de ellas se correspondía con la rMDH.

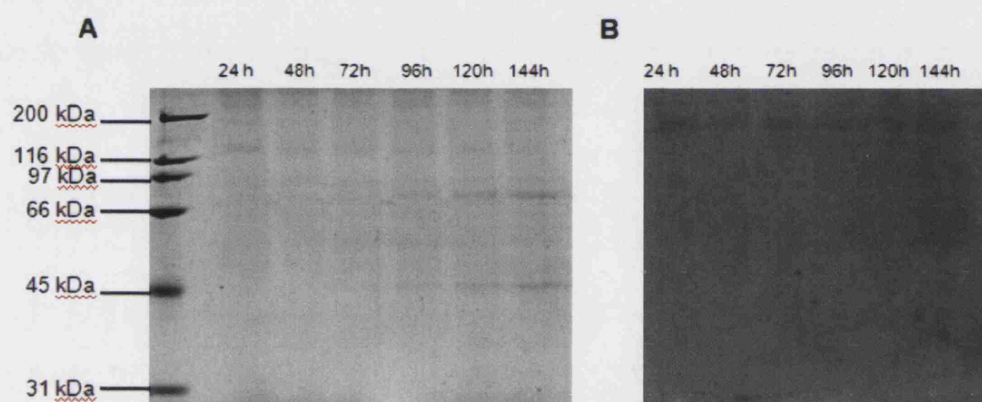


Figura 41: Análisis mediante PAGE-SDS (A) e inmunodetección con suero de pacientes (B) para detectar la expresión de rMDH en *Pichia pastoris* a 24 y 144 horas tras la inducción, utilizando los medios de cultivo BMGH y BMMH. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los gels o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

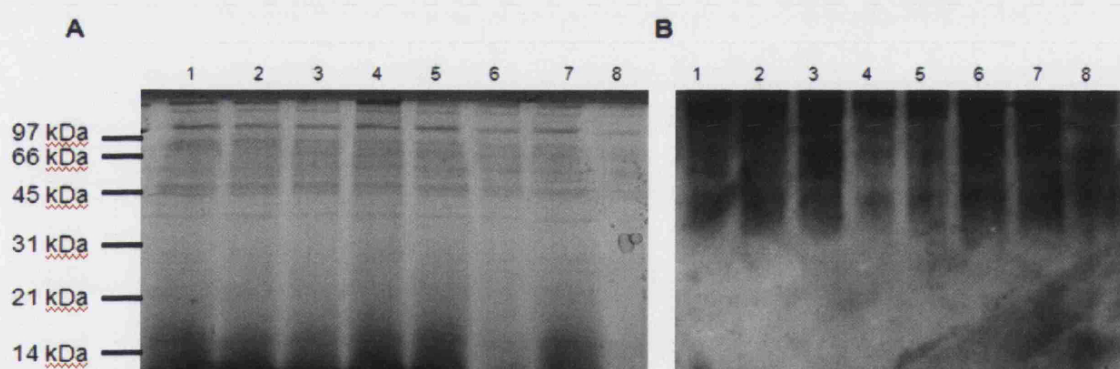


Figura 42: Análisis mediante PAGE-SDS (A) e inmunodetección con suero de pacientes (B) para detectar la expresión de rMDH en 8 colonias de *Pichia pastoris* a 72 horas tras la inducción utilizando medios MGYH y MMH. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los gels o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

2. Expresión de rMDH en Baculovirus

La rMDH fue finalmente expresada en células de insecto infectadas por Baculovirus. Como consecuencia del uso del medio de cultivo pBacPAK completo y debido a que éste contiene suero bovino fetal (FBS), la rMDH presentaba gran contaminación de albúmina. Para reducir esta contaminación, se

sustituyó el medio de cultivo completo por medio básico de Grace en el momento de la infección de las células Sf21, tras ser cultivadas las células en el primero, que es más adecuado para el correcto crecimiento celular. De este modo se redujo de manera significativa la cantidad de albúmina presente en el sobrenadante del cultivo (figura 43), donde se encontraba la rMDH.

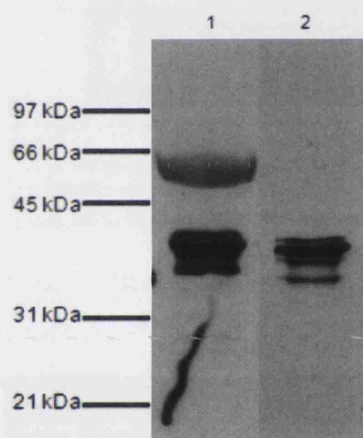


Figura 43: Inmunodetección con anticuerpo anti-MDH de la expresión de rMDH en Baculovirus utilizando medio pBacPAK completo (carril 1) y medio básico (carril 2). Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

La MDH recombinante se identificó mediante análisis de MS/MS, identificándose ocho péptidos de la MDH de sandía, de los que fueron secuenciados tres de ellos, confirmando la identidad de la proteína expresada.

Péptidos de la MDH
FADACL KELAGSIEK ISAHLHPPK SQMEESSALR LLGVTMLDVVR SQMEESSALRR ANTFVAEVLGLDPR NGIEEVYSLGPLNEYER

Tabla 6: péptidos identificados de la MDH de sandía mediante MS. Se muestran en rojo aquellos que fueron secuenciados en el análisis de MS/MS.

2.1 Ensayos de Titulación vírica

Los ensayos de titulación de los Baculovirus que contenían la secuencia de la MDH, se realizaron por duplicado. El resultado de la media del número de placas de lisis observadas fue de 21 en el pocillo correspondiente a la dilución 10^{-6} del inóculo vírico, lo que corresponde a un título de 2.1×10^8 pfu/ml.

Equivalencia inmunológica de rMDH y nMDH

En este caso, al igual que se hizo con la profilina, también se recurrió a la producción de un anticuerpo policlonal para comparar la respuesta inmunológica de la MDH natural y de la recombinante. Dicho anticuerpo se utilizó para realizar pruebas de inmunodetección y ELISA.

Se realizaron, además, experimentos de inmunodetección con sueros de pacientes. Se comprobó que la rMDH expresada presentaba capacidad de unión a las IgGs de conejo en el caso del anticuerpo policlonal, pero no a las IgEs de los pacientes, como se describe a continuación.

1. Reconocimiento de rMDH y nMDH por la IgG del antisuero de conejo

El anticuerpo policlonal anti-MDH reconocía de modo específico a la MDH, tanto en su forma recombinante como en la natural, formando parte del extracto completo de sandía. La dilución óptima establecida para el anticuerpo usado para inmunodetección fue de 1:10.000 a 1:20.000 (figura 44).

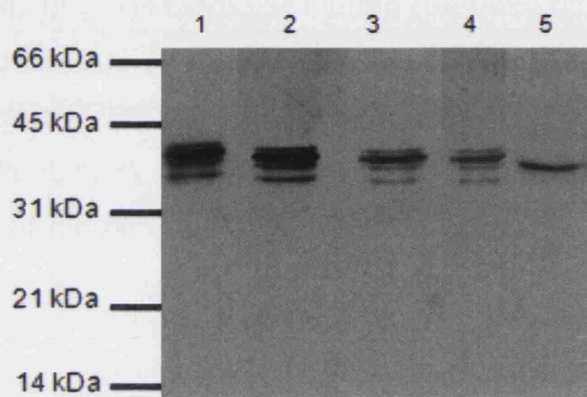


Figura 44: Titulación del anticuerpo policlonal anti-MDH producido en el laboratorio mediante inmunotransferencia. Se utilizaron diferentes diluciones del anticuerpo enfrentadas a rMDH. Carril 1: dilución 1/5000; carril 2: dilución 1/10000; carril 3: dilución 1/20000; carril 4: dilución 1/30000; carril 5: detección de MDH natural del extracto completo de sandía, dilución del anticuerpo 1/5000. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Además se realizó una titulación del anticuerpo anti-MDH mediante ELISA, con la malato recombinate de sandía expresada en las células Sf21 y utilizando BSA como control negativo. Se obtuvo una dilución óptima de 1:5.000 a 1:10.000, del anticuerpo en 1.5% de leche en PBS-T (figura 45).

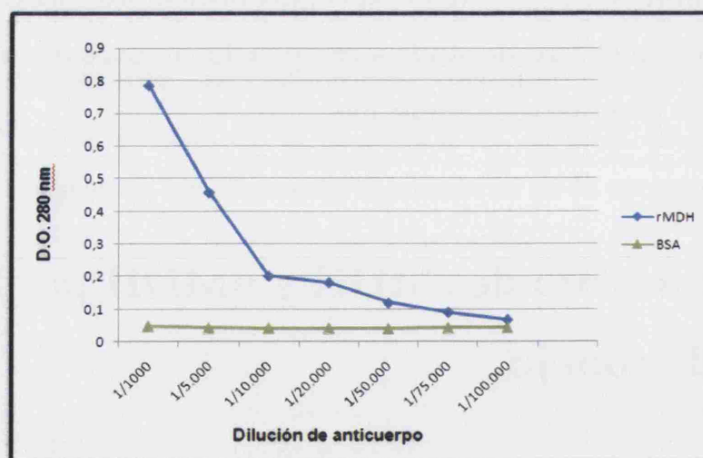


Figura 45: Titulación en ELISA de la unión del anticuerpo policlonal anti-MDH a MDH recombinante. Control negativo: BSA.

2. Reconocimiento de rMDH y nMDH por las IgEs de los sueros de los pacientes

En las inmunodetecciones realizadas con rMDH enfrentada a los sueros de pacientes no se observó reconocimiento de la proteína por parte de las IgEs (figura 46), por lo que la rMDH expresada no es inmunológicamente equivalente a la nMDH.

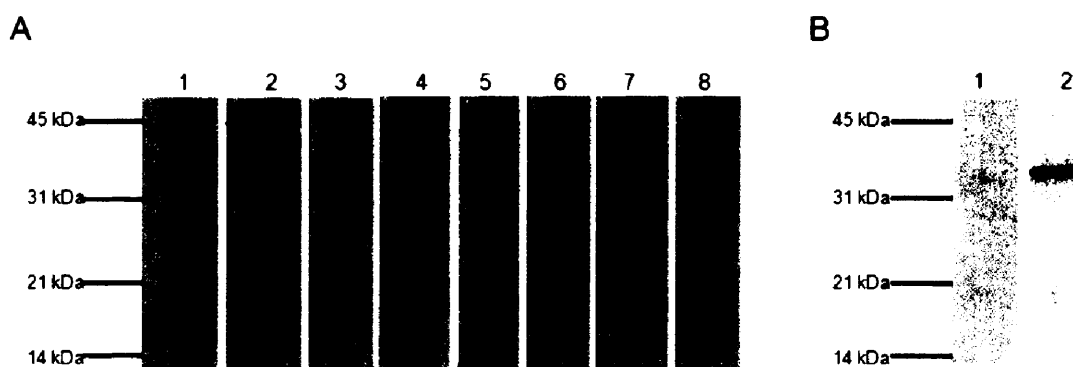


Figura 46: Panel A: Análisis mediante inmunodetección de la rMDH utilizando sueros de diferentes pacientes alérgicos a sandía (carriles 1-8). Panel B: Análisis mediante inmunodetección comparando la capacidad de la rMDH (carril 1) y de la nMDH (carril 2) de fijar la IgE presente en una mezcla de sueros de pacientes. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

Determinación de parámetros moleculares de la MDH a partir de predicciones teóricas

Para la malato deshidrogenasa, de 319 aminoácidos, se obtuvieron utilizando el programa Protpram del servidor Expasy, una masa molecular teórica de 37636.7 Da y un punto isoeléctrico teórico de 8.67.

Al igual que para la profilina, la estructura secundaria se realizó por el método de Garnier y col (1996), obteniéndose un 32.6% de estructura en alfa hélice, un 21.32% de lámina beta y un 46.08% de estructura aleatoria (figura 48).

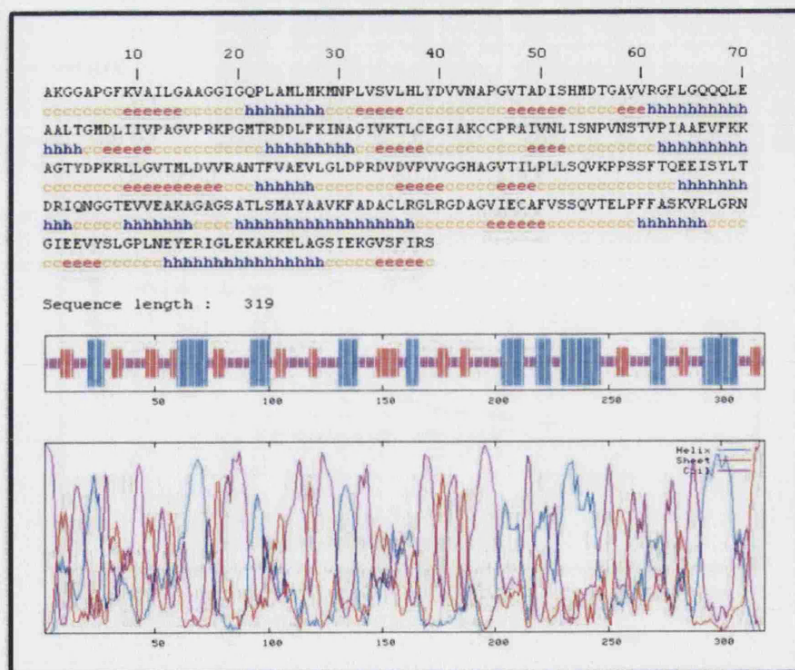


Fig. 48: Predicción de la estructura secundaria de la MDH de sandía según el método descrito por Garnier y col. En amarillo se encuentran representados los aminoácidos con ordenación aperiódica (c), en azul, la alfa hélice (h) y en rojo la lámina beta (e).

Para el modelado de la estructura tridimensional de la MDH de sandía también se empleó en programa Swiss-Model (Guex y Peitsch, 1997), como ya se hizo para el modelado de la profilina, esta vez utilizando el molde 1smkC, correspondiente a la propia MDH de sandía.

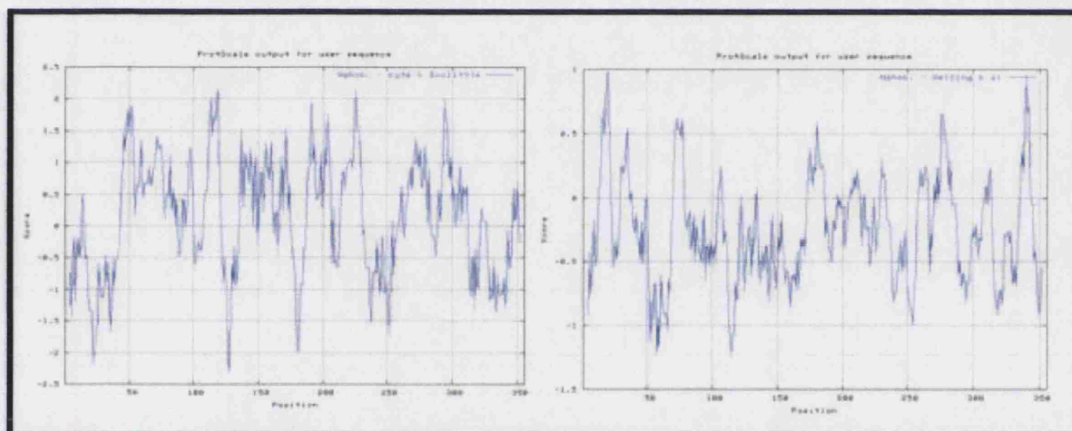


Fig 49: Predicciones teóricas de la hidrofobicidad (A) y antigenicidad (B) de la MDH de sandía, basadas en los modelos de Kyte y Doolittle (1982) y Welling y col. (1985), respectivamente.

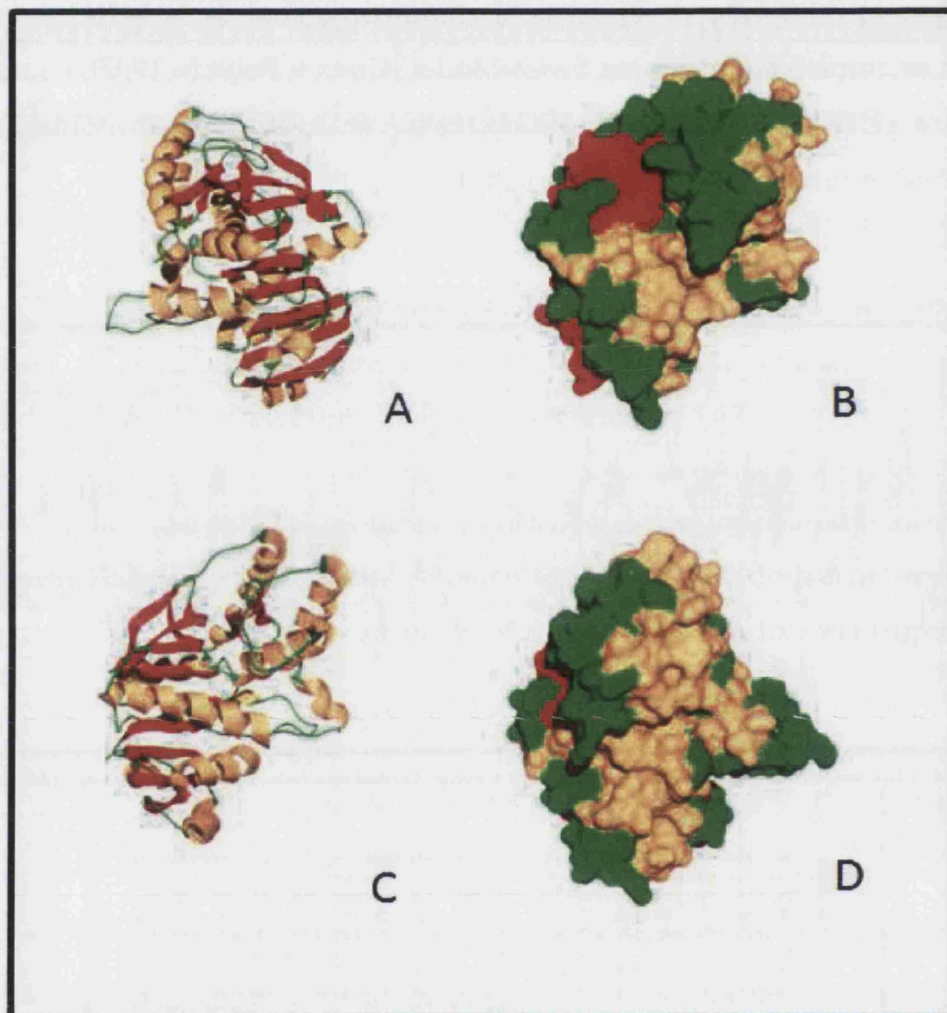


Fig. 50: Modelo teórico de la estructura tridimensional de la MDH de sandía. Se muestra en naranja las estructuras ordenadas en alfa-hélice, en rojo las láminas beta y en verde la ordenación aperiódica. A y B son vistas frontales de la proteína y C y D son el resultado de girar el modelo 180°C.

En lo referente a la polaridad de la MDH, puede observarse zonas polares y apolares distribuidas homogéneamente a lo largo de toda la estructura secundaria de la proteína (figura 49 A), como también se puede observar en su estructura terciaria (figura 51).

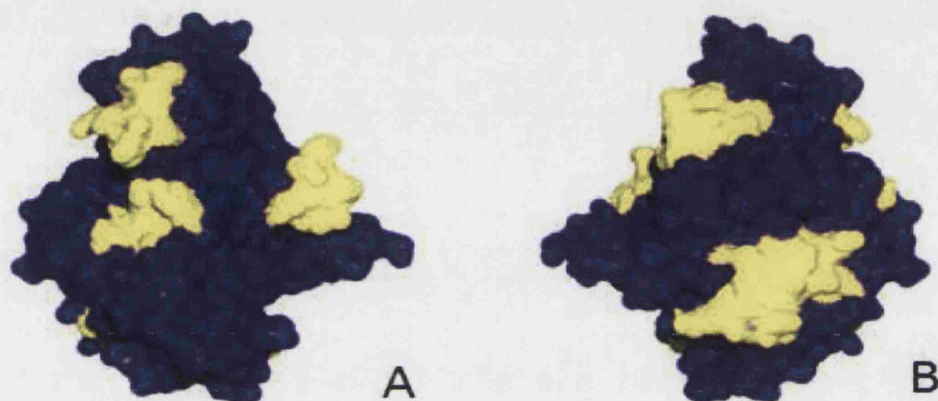


Fig. 51: Modelo teórico, según Kyte y Doolittle, de la estructura tridimensional de la MDH de sandía. Se muestran en amarillo los aminoácidos hidrofóbicos, sobre el modelo teórico de la estructura de la MDH de sandía. El modelo A es una vista frontal de la proteína y B es el resultado de girar el modelo 180°C.

Aplicando el método de Welling, como se hizo anteriormente con la profilina, se obtuvieron las regiones de potencial alergénico teórico de la MDH, comprendidas en los aminoácidos 13-21, 32-36, 74-78, 105-108, 173-186, 207-213, 229-233, 258-265, 275-283, 312-313, 336-343 (figuras 49 y 52).

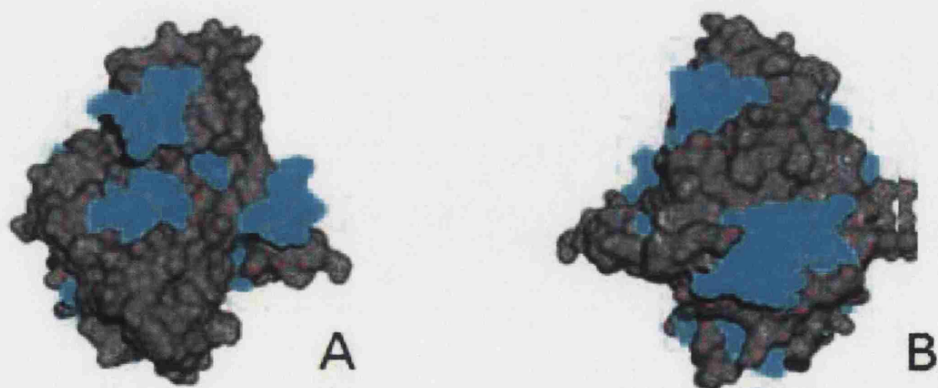


Fig. 52: Modelo según Welling y col. (1985), de la estructura de la MDH de sandía. Se muestran en azul los aminoácidos potencialmente alergénicos. El modelo A es una vista frontal de la proteína y B es el resultado de girar el modelo 180°C.

Detección de glicoproteínas: Tinción con concanavalina A

Para analizar la existencia de azúcares en la estructura de la rprofilina y de la rMDH se llevó cabo una tinción de las proteínas purificadas con la lectina ConA (que une específicamente residuos de manosa), aplicada en PAGE-SDS y transferida a membrana. Como control positivo de glicosilación se utilizó el la inmunoglobulina IgG y como control negativo BSA.

El resultado fue positivo para la glicosilación de forma recombinante de rMDH, pero no para la de la rProfilina (Figura 53).

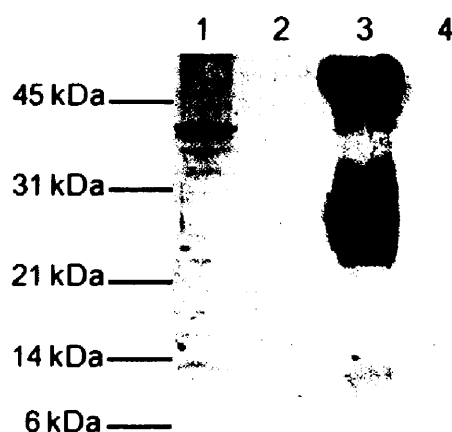


Fig. 53: Análisis mediante la tinción con ConA. 1: rMDH; 2: rProfilina; 3: IgG, utilizado como control positivo de glicosilación; 4: BSA, utilizado como control negativo de glicosilación. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la izquierda de los geles o inmunodetecciones, expresadas en kDa.

*DISCUSIÓN*_____.

1. Alergia a alimentos

La alergia a alimentos es una enfermedad frecuente cuya incidencia ha aumentado durante los últimos años ⁽²⁰⁾ y que conlleva una disminución en la calidad de vida del paciente, por lo que la identificación y caracterización de los alérgenos de las diferentes fuentes alergénicas se ha convertido en una necesidad de vital importancia, para lograr tanto una mejora en el diagnóstico de la enfermedad, como una terapia adecuada.

Los pacientes alérgicos a sandía presentaron en todos los casos una enfermedad de alergia por polen. Aunque el tamaño muestral no permite excluir la existencia de casos aislados y excepcionales de aparición de alergia a sandía en ausencia de polinosis, parece que la alergia a sandía se manifiesta, al igual que algunas frutas (por ejemplo el melón) en el seno de la enfermedad polínica. No obstante, en nuestro entorno se ha descrito alergia a otros alimentos de origen vegetal, como el melocotón, kiwi o mostaza, en los que un porcentaje notable de pacientes (20-30%) cursaron su alergia a alimentos en ausencia de polinosis.

Curiosamente, es en estos pacientes sin alergia al polen en los que se encuentra una mayor prevalencia de reacciones graves, sistémicas o generalizadas, llegando a afectar a más del 50% ⁽¹²³⁾. Otro dato interesante de los pacientes alérgicos a sandía, relacionado con la polinosis fue la mayor frecuencia de asma en relación con la población polínica.

Como ya se ha mencionado en la introducción, pocos estudios se han llevado a cabo hasta la fecha en el campo de la alergia a la sandía, y los que se habían realizado se centraban en la reactividad cruzada existente entre la sandía y el polen de otras fuentes alergénicas, así como en la existencia de proteínas capaces de fijar IgE. No fue hasta más tarde cuando se describió la presencia de un alérgeno de 14 kDa en la sandía, gracias a los estudios de Jordan-Wegner et al. ⁽¹⁰⁴⁾ y Asero et. al. ⁽¹⁰⁵⁾, quienes describieron los síntomas orales que presentaban los pacientes alérgicos a sandía.

El estudio de los alérgenos de sandía puede aportar información de gran interés acerca del conjunto de la alergia a alimentos, ya que además de ser una fruta muy consumida en España, presenta reactividad cruzada con otras frutas ^{(102) (103) (116)}, así como con pólenes ^{(124) (125)}.

2. Pacientes

Dentro del grupo de pacientes estudiados en esta tesis, ninguno presentaba reacciones alérgicas con síntomas sistémicos, que generalmente se producen en respuesta a la sensibilización a alérgenos resistentes a enzimas gástricas. Esto ocurre en la alergia a otras frutas, como en el caso del melocotón, donde el 26% de los afectados presenta síntomas sistémicos, relacionados con la sensibilización a la LTP ⁽¹²³⁾. Los alérgenos de sandía son alérgenos lábiles y rápidamente degradados tras su ingestión. Este hecho fue confirmado con los resultados obtenidos en los ensayos realizados para establecer la sensibilidad a las enzimas gástricas de los alérgenos de la sandía (figura 19), lo que concuerda con los síntomas fundamentalmente orales que presentaban los pacientes seleccionados.

Para lograr un correcto diagnóstico de alergia a alimentos es muy importante realizar una exhaustiva historia clínica, siendo necesario interrogar al paciente sobre las características de la reacción sufrida y la relación temporal entre la ingesta del alimento y la aparición de síntomas.

Las reacciones alérgicas causadas por alimentos suelen aparecer dentro de los 60 minutos siguientes a su ingestión, algunas en concreto aparecen dentro de los primeros 30 minutos, aunque también pueden aparecer reacciones alérgicas que se inician transcurridos de 30-60 minutos tras la ingestión del alimento aunque éstas son situaciones poco frecuentes.

La cantidad de alimento ingerida puede utilizarse para calcular la dosis de inicio de las pruebas de provocación oral, por lo que es un dato de gran valor con los alimentos que producen reacciones generalizadas. Sin embargo, en el caso de la alergia a sandía, donde el 100% de los pacientes cursa con SAO exclusivamente, este dato adquiere una menor relevancia

Por regla general, después de realizar la historia clínica se tiene una idea de cuál es el alimento causante de la alergia. El siguiente paso es solicitar pruebas de laboratorio que confirmen ese diagnóstico, que consisten fundamentalmente en enfrentar el suero del paciente con los alérgenos del alimento sospechoso de causar la reacción alérgica, con el fin de determinar los valores de IgE específicos.

Las pruebas de detección de IgE específica son de gran fiabilidad con algunos antígenos comerciales, pero de momento no es posible disponer de todos los alérgenos alimentarios correctamente estandarizados, al contrario de lo que ocurre con la mayoría de los aero-alérgenos. Lo que asegura la calidad de un extracto alérgico, entre otros criterios, es la correcta estandarización en la producción del mismo. En el pasado se obtenían resultados dispares y confusos, porque que la única información que se tenía acerca de los extractos era la relación peso/volumen de proteínas alérgicas. Para evitar esto se han establecido unos criterios, especificando la necesidad de que los extractos alérgicos estuvieran caracterizados y que se realizara una cuantificación de la actividad biológica, así como del alérgeno principal ⁽¹²⁶⁾.

Aunque las pruebas de laboratorio con extractos de calidad tienen una buena sensibilidad cuando se utilizan en el diagnóstico, su baja especificidad hace que los resultados no sean comparables con los obtenidos en las pruebas de provocación.

Actualmente se está trabajando para mejorar la calidad de los extractos (alérgenos naturales y recombinantes, por ejemplo) y para optimizar el empleo de nuevas técnicas, como los microarrays con proteínas purificadas o con péptidos que conforman los epítopos de las proteínas alérgicas, que podrían

permitir en un futuro cercano la realización de los diagnósticos a partir de una muestra de sangre. Sin embargo aún no es posible la supresión de las pruebas de provocación oral, que son la mejor herramienta para el diagnóstico final de la alergia alimentaria.

Los pacientes seleccionados para esta tesis, además de la alergia a sandía, padecían una polinosis con síntomas de rinitis alérgica, presentando un elevado porcentaje de ellos asma primaveral asociada, concretamente el 78.3%. Aunque se desconoce la razón final de ello, se atribuye a la reactividad cruzada existente entre los pólenes y las frutas. Por esta misma razón, muchos de ellos eran también alérgicos a otras frutas, sobre todo de la familia de las cucurbitáceas, por ser mayor la semejanza existente entre los miembros de una misma familia. Este patrón de alergia a frutas y a polen, también se ha observado en otros casos, como en la alergia al aguacate y al melón, donde se analizaron más de 900 pacientes de numerosos centros hospitalarios españoles (Red Vegetalia, Instituto Carlos III, MSC, España, Trabajo en preparación).

La semejanza existente entre las profilinas no permite descartar la posibilidad de que la sensibilización a la sandía sea consecuencia de una primera sensibilización a pólenes, ya que la hipótesis más aceptada en la actualidad es que la alergia a frutas sea consecuencia de la reactividad cruzada con pólenes. Sin embargo, la TPI hasta ahora no ha sido caracterizada como alérgeno del polen (Red Vegetalia, Instituto Carlos III, MSC, España, Trabajo no publicado), por lo que no se descarta que exista una sensibilización de los pacientes directamente a algunas de las proteínas de sandía.

En realidad, la sensibilización a casi cualquier fruta o vegetal podría estar causada por una sensibilización a profilina, del mismo modo que la sensibilización al polen podría deberse también a la profilina ⁽⁴⁹⁾, ya que es un panalérgeno y presenta reactividad cruzada con una larga lista de profilinas presentes en otras fuentes vegetales ^{(49) (127) (124) (125)}. De todos modos, la relevancia clínica de la profilina sigue cuestionándose, ya que el elevado grado de reactividad cruzada existente, no siempre se traduce en síntomas clínicos ^{(128) (127)}.

Es decir, aunque el paciente tenga resultados positivos para profilina en las pruebas diagnósticas, esto no significa que padezca síntomas a ese polen o alimento (atopía latente).

En este trabajo, los pacientes estudiados presentaron resultados positivos en las pruebas cutáneas a multitud de extractos, lo cual no necesariamente significa que exista una reacción alérgica a todos ellos, sino que podría ser que únicamente estén sensibilizados a ellos, bien porque están en la fase asintomática previa al desarrollo de la alergia, o porque las IgEs presentes en su organismo reaccionan frente a dichos compuestos porque comparten epítomos con otros a los que sí están sensibilizados, es decir, por reactividad cruzada. Esto nos da una información de gran utilidad, puesto que aquellos alimentos también deberán ser eliminados de la dieta del paciente, por el riesgo que conlleva su consumo.

3. Anticuerpos policlonales

A lo largo de este trabajo se han desarrollado dos anticuerpos policlonales, producidos en conejo, que han sido de gran ayuda a la hora de la caracterización de los alérgenos. Se trata de anticuerpos muy sensibles, aunque presentan ciertas diferencias en cuanto a sus características. En el caso del anticuerpo anti-profilina, producido tras la inyección intramuscular de profilina recombinante de sandía, se trata de un anticuerpo altamente sensible, ya que su dilución recomendada es 1:100.000, dilución a la cual dicho anticuerpo resulta muy específico, como se puede observar al ser utilizado frente al extracto completo de sandía, donde ninguna otra proteína resulta reconocida (figura 28). Además este anticuerpo ha resultado ser de gran utilidad para la detección de otras profilinas (figura 26).

El anticuerpo anti-MDH fue producido inmunizando al conejo con una MDH procedente de otro organismo, concretamente de cerdo. Debido a que se trata de proteínas homólogas, con un 71% de identidad al alinear sus secuencias,

la MDH de sandía es reconocida por el anticuerpo, aunque se puede observar una disminución de la sensibilidad. La dilución recomendada aumenta hasta 1:10.000 (figura 45).

4. Alérgenos de sandía

En el caso de la alergia a la sandía, se pudo observar que los sujetos de estudio estaban sensibilizados a una gran variedad de proteínas, con masas moleculares comprendidas entre 12 y 70 kDa.

En esta tesis fueron identificados, mediante técnicas de SDS-PAGE e inmunodetección, tres de las proteínas alergénicas de sandía: la profilina, la MDH y la TPI. En los tres casos se trata de alérgenos principales, ya que eran reconocidos por más de la mitad de los pacientes, como se ha especificado anteriormente.

La identificación de los alérgenos de sandía presentaba cierta dificultad por poseer esta fruta un bajo contenido proteico y elevado en azúcares. Si estos no hubieran sido eliminados del extracto, su concentración podría haberse visto incrementada al utilizar técnicas comunes, como la ultrafiltración, precipitación, etc. Esto reduciría el paso de la corriente eléctrica a través del gel durante la electroforesis, dando lugar a un patrón proteico distorsionado. Como consecuencia, la detección de bandas con capacidad de unir IgEs en inmunodetección se hubiera visto considerablemente reducida llegando a ser incluso indetectable ⁽¹⁰⁶⁾. Para la eliminación de los componentes azucarados y por tanto de estos inconvenientes, se hizo pasar el extracto de sandía en una columna de cromatografía de intercambio iónico, la Q-Sepharose (GE-Healthcare) que permite la eliminación de los azúcares presentes y de otros componentes no proteicos, obteniéndose un extracto enriquecido en proteínas.

En la actualidad, existen otros métodos para eliminar los azúcares de los extractos de proteínas, pero implican complejos procesos homogeneización de las frutas a bajas temperaturas ⁽¹²⁹⁾, que pueden alargar el protocolo, mientras que el método elegido en este trabajo, basado en un solo paso de cromatografía, permite la correcta detección mediante inmunodetección de bandas que unen IgE.

4.1. Identificación de alérgenos

La identificación de las proteínas se realizó por dos métodos: la secuenciación del extremo amino terminal y la espectrometría de masas. Este segundo método dio mejores resultados ya que la secuenciación de Edman no resultó exitosa para la identificación de la TPI y de la profilina, posiblemente por encontrarse bloqueados sus extremos amino terminales. Las causas más frecuentes de estos bloqueos son diferentes modificaciones, tales como formilación, acetilación, acilación y ciclación de los residuos de glutamina, aunque no se ha estudiado cuál de ellas nos afecta en este caso. Las dos proteínas que no pudieron ser identificadas por degradación de Edman, fueron identificadas mediante análisis de MS/MS (tabla 4).

Las tres proteínas identificadas están altamente conservadas en el reino vegetal (www.uniprot.org). En el caso de la TPI, no fue posible su identificación directamente a partir de la secuencia de péptidos, porque esta proteína aún no ha sido secuenciada en sandía. De todos modos, la semejanza existente entre las TPIs de otros alimentos vegetales es muy elevada. La secuenciación de dos de sus péptidos internos confirmó un 100% de identidad con los péptidos de TPIs de otras especies, como arroz (*Oryza sativa*), patata (*Solanum tuberosum*), trigo (*Triticum aestivum*), lechuga (*Lactuca sativa*), maíz (*Zea mais*), cebada (*Hordeum vulgare*), así como también había un 100% de identidad con péptidos de TPI de organismos lejanos filogenéticamente, como el ratón, rata o humano. Por todo esto se puede considerar que la proteína de 28 kDa se trata de la TPI de sandía.

De todos modos, en el futuro, el clonaje de la TPI de sandía nos permitirá conocer su secuencia y se podrá evaluar con exactitud la similitud existente entre esta y las TPIs de otras fuentes de alimentos vegetales.

La MDH y la TPI, al igual que la profilina, que ha sido descrita en multitud de alimentos vegetales y pólenes ⁽⁵⁰⁾ ⁽²¹⁾ ⁽¹³⁰⁾ ⁽²³⁾, ya habían sido previamente aisladas y caracterizadas como alérgenos en otras fuentes. La MDH fue descrita por primera vez como alérgeno en la levadura *Malassezia* ⁽¹³¹⁾. Más tarde también se describió en el género *Aspergillus* ⁽¹³²⁾ y en el polen de senecio ⁽¹³³⁾, pero ha sido este estudio cuando se ha descrito por primera vez como alérgeno alimentario.

La TPI se describió como alérgeno en látex ⁽¹³⁴⁾, en trigo ⁽¹³⁵⁾, en lichi ⁽¹³⁶⁾ y en el insecto *Forcipomyia taiwana* ⁽¹³⁷⁾. Más tarde también se describió en crustáceos, como la gamba común (*Crangon crangon*) o *Archaeopotamobius sibiricus*, pero en estos últimos aún no han sido publicado (www.allergome.org).

Aunque no es un objetivo de este estudio evaluar la alergia a lichi o a trigo, se revisó la historia clínica de los pacientes seleccionados y ninguno de ellos refirió síntomas tras la ingestión de estos alimentos, por lo que, tras descartar la posibilidad de una sensibilización causada por reactividad cruzada, podemos afirmar que la TPI de sandía sí puede ser capaz de sensibilizar a los pacientes por vía oral.

4.2. Profilina

La profilina es un panalérgeno muy conservado en organismos eucariotas y responsable de muchos de los procesos de reactividad cruzada presente entre diversas fuentes de origen vegetal como ocurre entre pólenes y alimentos, como se ha mencionado anteriormente.

La profilina se ha descrito como un alérgeno menor, pero de gran importancia, en una gran variedad de pólenes y alimentos, con un porcentaje de pacientes sensibilizados cercano al 20% ⁽⁴⁴⁾ ⁽¹²⁷⁾, pero además de en la sandía, también ha sido descrito como alérgeno principal en otras frutas, como son el melón ⁽⁹⁹⁾, la manzana ⁽¹³⁸⁾ o la naranja ⁽¹³⁹⁾. Las diferencias encontradas en los porcentajes de sensibilización de los pacientes podrían deberse a factores geográficos, ya que normalmente los estudios realizados acerca de la prevalencia de la profilina se han realizado en áreas del norte de Europa, donde la alergia al polen de abedul es predominante, mientras que si estos estudios se hubieran llevado a cabo en regiones con mayoría de otros pólenes, como en Italia, donde predominan la ambrosía y las gramíneas, seguramente los pacientes mostrarían una mayor sensibilización a la profilina ⁽¹²⁸⁾.

La importancia de la identificación y caracterización de la profilina radica en que, como ya se ha comentado, es una proteína que acarrea gran controversia en lo que se refiere a su relevancia clínica. Existen estudios en los que se afirma tanto que existe poca correlación entre la reactividad a profilina en los test realizados *in vitro* y la clínica de la alergia a alimentos ⁽²¹⁾ ⁽⁴⁹⁾ ⁽¹⁴⁰⁾, como que en efecto se trata de un alérgeno clínicamente relevante ⁽¹⁰⁵⁾ ⁽¹⁴¹⁾. Las discrepancias observadas respecto a la relevancia clínica de este alérgeno se deben, muy posiblemente, al criterio de selección de los pacientes: si éstos son seleccionados en base a la reactividad de las IgE séricas, entonces parece que la relevancia clínica disminuye, mientras que si el criterio es la historia clínica de alergia a alimentos, la relevancia clínica de la profilina aumenta ⁽¹²⁸⁾.

En cuanto a la purificación de la profilina natural de sandía, aunque en este trabajo se ha purificado por métodos de cromatografía convencionales, se obtienen mejores resultados al usar la cromatografía de afinidad, basada en la Sepharose-poly-prolina. Los rendimientos de purificación obtenidos fueron muy elevados, si se comparan con los obtenidos para la purificación de otras fuentes, como en el caso de *Phaseolus vulgaris* ⁽¹⁴²⁾, donde se obtenían de 1 a 3 µg/ml de profilina del total de proteínas de extracto, frente a los 10 µg/ml que se

consiguen de profilina de sandía. Probablemente, esto se deba a que la cantidad de esta proteína en la sandía es mucho mayor que en otras fuentes, lo cual no actúa en detrimento de la validez de esta profilina, sino que remarca aún más su valor como profilina modelo para el diagnóstico de sensibilización a profilinas de alimentos vegetales por su facilidad de obtención.

A nuestro parecer, la caracterización de la profilina de sandía, lejos de ser la caracterización de una profilina más dentro del amplio panel de profilinas descritas, es una cuestión de gran trascendencia, ya que se trata de una fruta con una de las mayores frecuencias de reconocimiento a esta proteína dentro de las alergias a alimentos de origen vegetal.

En lo que a la clonación de la profilina de sandía se refiere (GI: 52352488), es necesario mencionar que esta proteína no sufre modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación. A pesar de que la clonación de las profilinas de otras fuentes se había llevado a cabo con éxito en sistemas de expresión procariotas, como *E. coli*, en nuestro caso se optó por la expresión en *Pichia pastoris*, una levadura.

P. pastoris es un sistema que permite la expresión de grandes cantidades de proteína recombinante, así como una purificación relativamente sencilla y cómoda, debido a que la proteína producida es secretada al medio extracelular, gracias a la secuencia del factor α incluida en el vector de expresión utilizado, cuya función es dirigir la proteína fuera de la célula. Este método presenta ventajas sustanciales frente a la purificación de proteínas recombinantes producidas en *E. coli*. Se ha observado que al expresar proteínas recombinantes en sistemas bacterianos, es frecuente la formación de agregados insolubles, como los cuerpos de inclusión, así como agregados por oligomerización, que pueden llevar a la producción de proteínas biológicamente inactivas ⁽¹⁴³⁾. En el mejor de los casos, las proteínas han de ser purificadas a partir de un lisado celular, lo que complica en gran medida el proceso y reduce el rendimiento.

En este caso, el vector de expresión de *Pichia pastoris*, pPICZ α A, permite la expresión de la proteína recombinante como una proteína de fusión, dentro del

mismo marco de lectura que la cola de histidinas, añadida a la secuencia de la profilina mediante técnicas de PCR, lo que también facilita su purificación mediante cromatografía de afinidad.

La forma recombinante de la profilina puede, en algunos casos, presentar una actividad reducida, debido a que en las fuentes naturales existen múltiples isoformas de la forma natural, mientras que la forma recombinante es solo una de ellas ⁽¹⁴⁴⁾ ⁽¹⁴⁵⁾ o debido a un posible plegamiento incorrecto de la proteína al ser expresada en un sistema foráneo ⁽⁴⁴⁾, aunque esto es más frecuente al expresar en bacterias ⁽¹⁴³⁾.

Existen estudios que sugieren que la profilina natural de muchas de las fuentes vegetales es más apropiada para el diagnóstico y ofrece mejores resultados que las formas recombinantes, al menos en los ensayos realizados *in vitro* ⁽¹⁴⁵⁾ ⁽¹²⁷⁾. En este trabajo se demuestra que en el caso de la profilina recombinante de sandía, ésta puede ser de gran ayuda a la hora de evaluar la sensibilización a esta fruta.

Por otro lado, el uso de la profilina recombinante es altamente recomendable, ya que se trata de una fuente económica y casi inagotable de esta proteína. La profilina de sandía, alérgeno principal en esta fruta, podría ser un candidato perfecto como modelo para estudiar la sensibilización a profilinas de alimentos de origen vegetal, así como Pru p 3 es el prototipo de la familia de las LTPs como alérgenos alimentarios ⁽¹⁴⁶⁾ ⁽¹⁴⁷⁾.

La purificación de las profilinas fue confirmada mediante PAGE-SDS, donde se observó la presencia de una banda proteica en el caso de la profilina natural (figura 20), mientras que en el de la profilina recombinante aparecían claramente tres bandas de diferentes masas moleculares (figura 23). Esto podría deberse a la introducción de diferentes modificaciones post-traduccionales por parte del sistema de expresión de *P. pastoris*. Tales modificaciones no parecen ser diferentes grados de glicosilación, ya que en la tinción con Concanavalina A, lectina con afinidad por los residuos azucarados, se obtiene un resultado negativo para la presencia de glicoproteínas (figuras 53). De todos modos, se ha

observado que la profilina natural puede aparecer como dos o incluso tres bandas proteicas, como en el caso de las profilinas de muchos pólenes (figura 26).

No obstante, para comprobar la identidad de las tres bandas de profilina recombinante, éstas se identificaron mediante espectrometría de masas, resultando todas ellas profilina (figura 24). Este resultado también fue confirmado con los ensayos de inmunodetección realizados con los sueros de pacientes y con el anticuerpo policlonal producido en nuestro laboratorio, siendo reconocidas las tres bandas tanto por las IgEs de los pacientes como por la IgG del conejo específica anti profilina (figura 23). Además, también se realizaron pruebas de inhibición, en inmunodetección (figura 28) y en ELISA (figura 29) para asegurar los resultados obtenidos previamente.

El test de activación de basófilos realizado con profilinas natural y recombinante, muestra que la IgE específica frente a profilina es capaz de provocar la desgranulación de los basófilos en pacientes alérgicos a sandía. Esto significa que existe una actividad biológica del alérgeno, quedando demostrada su relevancia clínica en el caso de la alergia a la sandía. Igualmente existe la posibilidad de utilizar la profilina recombinante para propósitos clínicos, en lugar de la forma natural, cuya obtención está sujeta a variables como, por ejemplo, la existencia de fruta en ese determinado tiempo y lugar.

La producción de la forma recombinante de la profilina permite la evaluación de esta proteína como alérgeno. De hecho se realizó una comparativa de la equivalencia inmunológica de ambas formas, natural y recombinante, que presentaban la misma reactividad frente a las IgEs de los pacientes, resultando ser equivalentes en pruebas de diagnóstico *in vitro* como ELISA, inmunodetección y Basotest. En pruebas *in vivo*, como son las pruebas cutáneas, no se ha podido probar la utilidad de esta profilina recombinante como marcador de sensibilización, debido a que no teníamos la autorización del Comité Ético necesaria para el uso de proteínas recombinantes en pacientes.

Sin embargo, en otros países de la unión Europea, ya se han realizado estudios con alérgenos recombinantes, obteniéndose muy buenos resultados,

como en el realizado por Jutel et. al. ⁽¹⁴⁸⁾, que utilizó una mezcla de 5 alérgenos recombinantes del polen de *Phleum pratense*, para el tratamiento de los pacientes alérgicos. En ese estudio, los pacientes desarrollaron una fuerte respuesta de tipo IgG a esos alérgenos, observándose una clara disminución de los síntomas de la alergia y de la dosis de medicamento necesaria.

El uso de los alérgenos recombinantes ofrece la posibilidad de realizar un diagnóstico a nivel molecular, por tanto más específico, así como un tratamiento personalizado para cada paciente. Esto mejoraría en seguridad y efectividad a la actual SIT, que conlleva varios inconvenientes, a pesar de ser un tratamiento bien establecido para el tratamiento de las alergias. Los posibles efectos adversos de la SIT son, entre otros, la posibilidad de una reacción severa mediada por IgE debido a la administración sistémica del alérgeno; adquisición de nuevas sensibilizaciones, puesto que se está administrando una mezcla de alérgenos a todos los que el paciente no tiene por qué estar sensibilizado. Además hay que añadir que, en muchos casos, no se pueden alcanzar las dosis de mantenimiento debido a los efectos secundarios de los extractos no estandarizados ⁽¹⁴⁹⁾ ⁽¹⁵⁰⁾ ⁽¹⁵¹⁾. Además, el uso de las proteínas recombinantes se puede aplicar a la producción de hipoalérgenos para una inmunoterapia más segura para el paciente. Además un panel de alérgenos recombinantes sería un perfecto sustituto de los extractos no estandarizados, que facilitarían un diagnóstico más exhaustivo de los componentes que provocan la sensibilización ⁽¹⁵²⁾.

Centrándonos en el caso de la profilina, los pacientes sensibilizados a este panalérgeno son tendentes a desarrollar el síndrome de alergia a pólenes y alimentos, debido a que se trata de una proteína ubicua. Además, tal y como ocurre con otros alérgenos responsables de este síndrome, son fácilmente degradados durante su almacenamiento o protocolo de extracción, siendo el uso de alérgenos recombinantes una buena alternativa ⁽¹⁵²⁾, como se ha demostrado en las pruebas de diagnóstico *in vitro* realizadas con la profilina de sandía.

La elevada similitud en las secuencias de las profilinas (figura 27) podría explicar la existencia de sensibilización a profilinas de diferentes fuentes vegetales, así como las diferencias en dichas secuencias podría explicar los distintos patrones clínicos observados en los pacientes. Se ha descrito el hecho de que la gran especificidad de las IgEs hacia epítomos variables, podría influir en la manifestación clínica de la sensibilización a la profilina ⁽¹⁵³⁾.

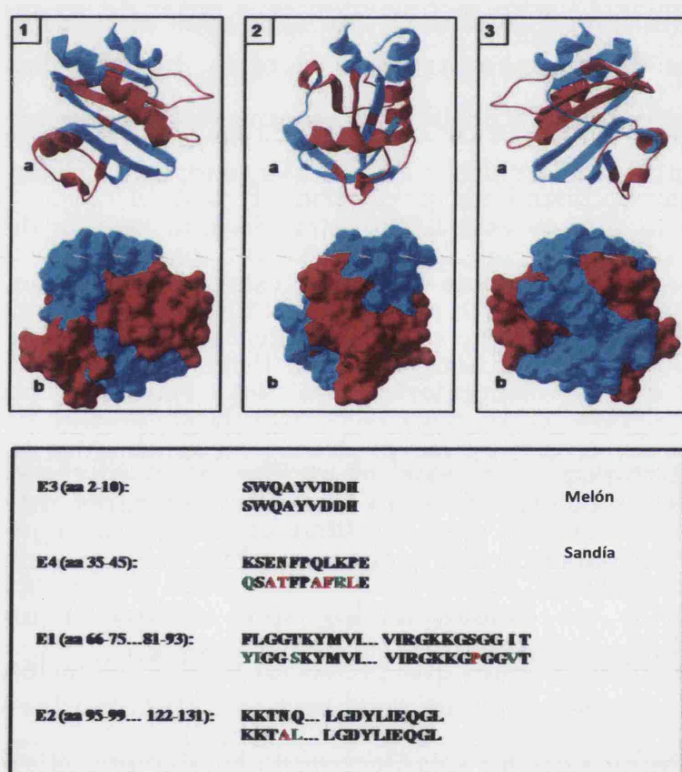


Fig. 53: Diagramas de la estructura secundaria (a) y terciaria (b) de la profilina de sandía, mostrando en azul los principales epítomos encontrados en Cuc m 2 ⁽⁸²⁾: E1 (residuos 66-75 y 81-93), E2 (residuos 95-99 y 122-131), E3 (residuos 2-10) y E4 (residuos 35-45). Los paneles 1 a 3 difieren en una rotación de 90° en sentido de las agujas del reloj sobre el eje vertical.

En la parte inferior aparecen las secuencias de los epítomos de Cuc m 2 y las secuencias equivalentes de la profilina de sandía. En color verde aparecen los aminoácidos equivalentes y los no equivalentes aparecen en rojo (Porcentaje de identidad = 42/56 (75%)). Positivas (48/56 (85%)).

Comparando las secuencias que conforman los epítomos principales de Cuc m 2 ⁽³⁾ con las secuencias equivalentes en la profilina de sandía (figura 53), se ha observado que en ambos casos, melón y sandía, los epítomos de la profilina se encuentran situados en la superficie de la proteína. Se ha observado que existe un 75% de identidad, que contando con los aminoácidos equivalentes pasa a ser de un 85% de similitud. Las diferencias existentes podrían ser una razón que

explique las diferencias encontradas en los síntomas de aquellos pacientes alérgicos a melón y aquellos que lo son a sandía.

El conocimiento de la secuencia de nucleótidos de la profilina de sandía permitirá, en un futuro próximo, el diseño de péptidos solapantes, que a través de técnicas de microarrays, ayudará a averiguar cuáles son las secuencias lineales que conforman los epítomos secuenciales de la profilina y las diferencias epitópicas existentes respecto a otras profilinas. Esto abrirá la posibilidad de un mayor conocimiento de las diferencias encontradas en las manifestaciones clínicas de las alergias alimentarias de los pacientes con sensibilización a profilina y su posible evolución ⁽¹⁴⁵⁾.

El modelado teórico de la estructura de la profilina, así como los tests de antigenicidad e hidrofobicidad realizados, podrían ser de gran ayuda para interpretar los resultados que se obtengan gracias a las técnicas de microarrays.

La evolución de los pacientes no se puede prever teniendo en cuenta únicamente la hipótesis de sensibilización a la molécula completa, como ya ha sido demostrado en otros estudios, como en los realizados sobre la alergia a la caseína de la leche de vaca ⁽⁶⁶⁾, la alergia al trigo ⁽⁶⁵⁾, o la alergia al cacahuete ⁽⁶⁴⁾. Por otro lado, con ayuda de estas técnicas se podría llevar a cabo la producción de una profilina recombinante hipoalergénica que pueda ser utilizada en inmunoterapia, es decir, que preserve los motivos estructurales necesarios para el reconocimiento por parte de las células T y que induzcan la respuesta IgG, pero que no favorezca la unión de anticuerpos IgE ^{(149) (154) (155) (156) (157)}.

Se puede concluir que la forma recombinante de la profilina de sandía presenta un patrón de unión a IgE y una actividad biológica similares a las encontradas para la forma natural, lo que significa que la profilina recombinante es una potente herramienta de diagnóstico que también podrá ser utilizada en tratamientos de inmunoterapia, gracias a las técnicas de microarrays y biología molecular.

4.3. Malato deshidrogenasa (MDH)

La malato deshidrogenasa es una enzima implicada en el ciclo de Calvin, concretamente en la transformación del oxalacetato a malato, utilizando NAD⁺ como aceptor/donador de electrones.

Debido a que es la proteína a la que están sensibilizados el mayor número de los pacientes (96%), fue clonada y se expresó su forma recombinante, con el objetivo de utilizarla en un futuro para realizar numerosos estudios con esta proteína. Aunque se ha logrado purificar su forma natural a partir del extracto completo, no es un proceso fácil ni los rendimientos son muy elevados. Esto se debe a que son necesarios varios pasos cromatográficos, lo que se traduce en un aumento del tiempo empleado en la purificación y una disminución del rendimiento de la misma.

En este trabajo, la MDH natural se purificó a partir del extracto completo de sandía, pero sin obtener gran cantidad de proteína. Tal y como se ha comentado anteriormente, no se consiguió la MDH completamente purificada, ya que aparecía un contaminante de aproximadamente 40 kDa que no fue posible eliminar. Dicho contaminante, sin embargo, no afectaba a las pruebas de inmunodetección, porque no presentaba capacidad de unión a IgE. Sin embargo, esto trajo como consecuencia que no se pudiera cuantificar con exactitud la cantidad de MDH obtenida en la purificación, aunque si es de remarcar el bajo rendimiento obtenido en el proceso.

Debido a la dificultad existente en cuanto a la obtención de MDH natural a partir de un extracto de sandía, se decidió producir la forma recombinante, que permitiría la obtención de mayores cantidades de proteína.

Para la producción de la MDH recombinante se procedió del mismo modo que en el caso de la obtención de profilina recombinante, salvo que en este caso no pudo lograrse la expresión en el sistema de levaduras, que tan buen resultado ofreció para el otro alérgeno principal clonado en este trabajo, a pesar de que

mediante técnicas de PCR de colonias, se confirmó que la secuencia de esta proteína se encontraba insertada en el genoma de las levaduras. La MDH no era producida en este organismo, lo cual se comprobó mediante SDS-PAGE, inmunodetección con sueros de pacientes y detección de la cola de histidinas mediante el uso de anticuerpos específicos (figuras 38-42).

Tras intentar su expresión utilizando los medios BMGY y BMMY, de crecimiento e inducción de la expresión, respectivamente, que dieron buen resultado en la expresión de la profilina recombinante, se utilizaron otros dos medios diferentes, también recomendados en las instrucciones proporcionadas por el fabricante (pPICZαA Easy selection kit, Invitrogen), pero que tampoco dieron resultados satisfactorios, ni siquiera cuando se aumentaban los tiempos de inducción, como se recomienda para proteínas con una masa molecular elevada (158).

Debido a los problemas encontrados en la expresión en *P. pastoris* se procedió a la clonación y expresión de la secuencia de la MDH de sandía en otro sistema diferente, los baculovirus. Este sistema no fue seleccionado inicialmente debido a que, además de que se estaban consiguiendo buenos resultados utilizando *P. pastoris*, resulta un sistema de expresión que conlleva elevados costes de producción.

Los baculovirus poseen un ciclo vital de dos fases, que facilita su uso en aplicaciones biotecnológicas. Se usan desde los años 80 con gran éxito en la producción de proteínas eucarióticas (159) (160), ya que las proteínas recombinantes se expresan en células de insecto (Sf21). Inicialmente se utilizaron como agentes de control de plagas, ya que se trata de patógenos letales para los insectos, concretamente para los lepidópteros. Sin embargo, posteriormente se descubrió su potencial como vectores de sistemas de expresión de proteínas recombinantes, ya que a pesar de ser virus y de que es aconsejable manipularlos con ciertas medidas de seguridad, resultan muy seguros por no ser infecciosos para los

vertebrados y por ser inactivos sus promotores en la mayoría de los mamíferos (161).

Mediante esta técnicas sí se logró obtener MDH recombinante y, además, con un elevado rendimiento. La rMDH se comenzó a expresar a los pocos pases del inóculo vírico, lo que indica que el baculovirus recombinante obtenido poseía una alta capacidad infectiva, además de la elevada titulación que fue deducida más adelante.

Durante la expresión de la rMDH se decidió sustituir el medio de cultivo sugerido por el fabricante y comenzar a expresar la proteína recombinante en medio básico, debido a razones puramente prácticas referidas a su purificación: cuando se utiliza baculovirus como sistema de expresión, las proteínas recombinantes son recogidas del medio de cultivo, después de ser liberadas al medio extracelular tras la muerte y lisis de las células como consecuencia de la infección vírica. El medio de cultivo pBacPAK completo está suplementado con suero bovino fetal, por lo que la rMDH está “contaminada” por gran cantidad de albúmina. Al cambiar el medio completo por el medio básico de Grace’s en el momento de la infección, desaparece en gran medida esta albúmina, lo cual facilita su posterior purificación. El cambio de medio no ha de realizarse durante el período de crecimiento, ya que se trata de un medio básico, donde las células no alcanzarían la confluencia necesaria.

A pesar de los esfuerzos realizados para obtener la forma recombinante de la MDH de sandía, y de haber logrado optimizar un método para su producción, ésta no es reconocida por la IgE de los sueros de los pacientes alérgicos a sandía. En este caso, al contrario de lo que sucede con la profilina recombinante de esta fruta, la forma natural no puede ser sustituida por la recombinante. Esto se debe posiblemente a que las modificaciones post-traduccionales introducidas por las células de insecto no sean las mismas que las del organismo original, afectando a la capacidad de fijar IgE de los epítomos.

El modelado teórico revela una elevada coincidencia de las regiones antigénicas e hidrofóbicas de la molécula, que debería tenerse en cuenta al llevar a cabo un posible estudio de secuenciación de epítomos.

5. Perspectivas

Continuando la línea de este trabajo, se encuentran entre nuestros próximos objetivos, la caracterización epitópica de la profilina de sandía, mediante la técnica de los microarrays, para poder establecer marcadores de sensibilización, evolución y severidad.

También se encuentra entre los próximos objetivos la búsqueda de otros sistemas de expresión de la rMDH que permitan obtener una forma recombinante de esta proteína con capacidad de unión a las IgEs presentes en el suero de los pacientes, con el fin de poder llevar a cabo la caracterización epitópica de esta proteína.

Por otro lado se está comenzando el proceso de clonación del tercer alérgeno principal de la sandía, la TPI, para poder realizar un estudio comparativo de las propiedades moleculares de su forma recombinante y ver si es posible su selección como candidato a la sustitución de la forma natural (difícil de purificar) por la recombinante, estandarizada y que podría permitir un diagnóstico a nivel molecular y un tratamiento personalizado para los pacientes sensibilizados a esta proteína.

Además, esta proteína parece ser un alérgeno diferencial entre el melón y la sandía, ya que hasta la fecha no ha sido descrita en melón. Esto podría significar que en pacientes monosensibilizados a esta proteína no se daría sensibilización a melón por reactividad cruzada.

Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede concluir:

1. Los pacientes seleccionados presentaban un diagnóstico de alergia a sandía, con síntomas de alergia oral al ingerir esta fruta. El 100% de ellos presentaba polinosis, con un elevado porcentaje de asma asociada (78%).
2. Se purificaron mediante técnicas de cromatografía los tres alérgenos principales de la sandía y fueron identificados mediante espectrometría de masas como profilina (14 kDa), MDH (36 kDa) y TPI (28 kDa).
3. Se clonó la MDH de sandía y se expresó la forma recombinante utilizando el sistema de los Baculovirus, por no ser posible su expresión en *Pichia pastoris*. La MDH recombinante producida en Baculovirus no era reconocida por las IgEs específicas presentes en el suero de los pacientes, resultando inadecuada como sustituto de la forma natural.
4. La profilina natural de sandía se purificó con un elevado rendimiento, lo cual puede ser de gran ayuda en la práctica clínica.
5. Por primera vez se obtuvo la secuencia de la profilina de sandía, a partir de la cual se ha clonado y expresado en *Pichia pastoris*.
6. La profilina recombinante producida resultó ser inmunológicamente equivalente a la natural, lo que la convierte en un posible sustituto de ésta para el diagnóstico de la sensibilización a profilinas vegetales.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Prausnitz C., K nstner H. Studien  ber  berempfindlichkeit. *Centralbl Bakteriologie* 1921; 86:160.

(2) Pepys JF, Jenkins PA FAU, Festenstein GN FAU, Gregory PH FAU, Lacey ME FAU, Skinner FA. Farmer's lung. Thermophilic actinomycetes as a source of "farmer's lung hay" antigen (0140-6736 (Print)).

(3) Bennich HH, Ishizaka K, Johansson SG, Rowe DS, Stanworth DR, Terry WD. Immunoglobulin E. A new class of human immunoglobulin. *Immunochemistry* 1968; 5(4):327-8.

(4) Becker EL. Elements of the history of our present concepts of anaphylaxis, hay fever and asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29(7):875-95.

(5) Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001; 56(9):813-24.

(6) Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5):832-6.

(7) Dahl R, Andersen PS, Chivato T, Valovirta E, de MJ. National prevalence of respiratory allergic disorders. *Respir Med* 2004; 98(5):398-403.

(8) Buus S, Sette A, Colon SM, Miles C, Grey HM. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. *Science* 1987; 235(4794):1353-8.

(9) Bhalla PL, Singh MB. Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination. *Trends Biotechnol* 2008; 26(3):153-61.

(10) Aalberse RC. Structural features of allergenic molecules. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91:134-46.

(11) Radauer C, Breiteneder H. Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(3):518-25.

(12) Radauer C, Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(4):847-52.

(13) Mygind N, Dahl R, Pedersen S, Thestrup-Pedersen K. Allergens. *Essential allergy*. Oxford, U.K.: Blackwell Science, 1996: 81.

- (14) Dreborg S, Bousquet J, Lowenstein H, Frew AJ. Response to what is a major allergen. *Clin Exp Allergy* 1994; 24(7):610-1.
- (15) Benjamin DC, Berzofsky JA, East IJ, Gurd FR, Hannum C, Leach SJ et al. The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Annu Rev Immunol* 1984; 2:67-101.
- (16) Marsh DG FAU, Goodfriend LF, King TP FAU, Lowenstein HF, Platts-Mills TA. Allergen nomenclature.(0042-9686 (Print)).
- (17) King TP FAU, Hoffman DF, Lowenstein HF, Marsh DG FAU - Platts-Mills, Platts-Mills TA FAU - Thomas, Thomas W. Allergen nomenclature.(0105-4538 (Print)).
- (18) Host A, Jacobsen HP, Halken S, Holmenlund D. The natural history of cow's milk protein allergy/intolerance. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49 Suppl 1:S13-S18.
- (19) Sampson HA. Food allergy. Part 2: diagnosis and management. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(6):981-9.
- (20) Fernandez RM. Food allergy in *Alergologica*-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19 Suppl 2:37-44.
- (21) Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(1 Pt 1):27-36.
- (22) Fernandez-Rivas M, Benito C, Gonzalez-Mancebo E, de Durana DA. Allergies to fruits and vegetables. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19(8):675-81.
- (23) Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5):821-30.
- (24) Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S, Mills EN. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):906-10.
- (25) Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):930-5.
- (26) Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kim KK, Suh SW. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* 1995; 3(2):189-99.
- (27) Garcia BE, Lombardero M, Echechipia S, Olaguibel JM, Díaz-Perales A, Sanchez-Monge R et al. Respiratory allergy to peach leaves and lipid-transfer proteins. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(2):291-5.
- (28) Van Ree R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):910-3.

- (29) Pastorello EA, Pravettoni V, Farioli L, Ispano M, Fortunato D, Monza M et al. Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(5):1099-106.
- (30) Pastorello EA, D'Ambrosio FP, Pravettoni V, Farioli L, Giuffrida G, Monza M et al. Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(2 Pt 1):371-7.
- (31) Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell* 1995; 7(7):945-56.
- (32) Dunwell JM. Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1998; 15:1-32.
- (33) Dunwell JM, Purvis A, Khuri S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 2004; 65(1):7-17.
- (34) Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H et al. The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J* 1989; 8(7):1935-8.
- (35) Wen J, Vanek-Krebitz M, Hoffmann-Sommergruber K, Scheiner O, Breiteneder H. The potential of Betv1 homologues, a nuclear multigene family, as phylogenetic markers in flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* 1997; 8(3):317-33.
- (36) Wang CS, Huang JC, Hu JH. Characterization of two subclasses of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways. *Plant Mol Biol* 1999; 40(5):807-14.
- (37) Yu X, Ekramoddoullah AK, Misra S. Characterization of Pin m III cDNA in western white pine. *Tree Physiol* 2000; 20(10):663-71.
- (38) Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* 1992; 175(2):377-85.
- (39) Huang S, McDowell JM, Weise MJ, Meagher RB. The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol* 1996; 111(1):115-26.
- (40) Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB. Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002; 52(1):22-32.
- (41) Valenta R, Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P et al. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 1991; 253(5019):557-60.

- (42) Rihs HP, Chen Z, Rueff F, Petersen A, Rozynek P, Heimann H et al. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(6):1293-301.
- (43) Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(5):805-19.
- (44) Rodriguez-Perez R, Crespo JF, Rodriguez J, Salcedo G. Profilin is a relevant melon allergen susceptible to pepsin digestion in patients with oral allergy syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(3):634-9.
- (45) Pastor C, Cuesta-Herranz J, Cases B, Perez-Gordo M, Figueredo E, de las HM et al. Identification of Major Allergens in Watermelon. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149(4):291-8.
- (46) Wagner S, Breiteneder H. The latex-fruit syndrome. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):935-40.
- (47) Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S. Parietaria profilin shows only limited cross-reactivity with birch and grass profilins. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133(2):121-4.
- (48) Diez-Gomez ML, Quirce S, Cuevas M, Sanchez-Fernandez C, Baz G, Moradiellos FJ et al. Fruit-pollen-latex cross-reactivity: implication of profilin (Bet v 2). *Allergy* 1999; 54(9):951-61.
- (49) Van Ree R, Voitenko V, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 98(2):97-104.
- (50) Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 964:47-68.
- (51) Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(5 Pt 1):962-9.
- (52) Vieths S, Luttkopf D, Reindl J, Anliker MD, Wuthrich B, Ballmer-Weber BK. Allergens in celery and zucchini. *Allergy* 2002; 57 Suppl 72:100-5.
- (53) Gonzalez E, Villalba M, Rodriguez R. Immunological and molecular characterization of the major allergens from lilac and privet pollens overproduced in *Pichia pastoris*. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(2):313-21.
- (54) Rodriguez R, Villalba M, Batanero E, Gonzalez EM, Monsalve RI, Huecas S et al. Allergenic diversity of the olive pollen. *Allergy* 2002; 57 Suppl 71:6-16.

(55) Barderas RF, Purohit AF, Papanikolaou IF, Rodriguez RF, Pauli GF, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1.(0091-6749 (Print)).

(56) Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Caldironi G, Barocci F et al. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* 2002; 57(10):900-6.

(57) Van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C et al. Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 2000; 275(15):11451-8.

(58) Informe del Comité Científico de la AESAN sobre Alergias Alimentarias. Manuel Martín Esteban, Arturo Anadón Navarro, Elia Teso Canales, editors. AESAN-2007-001. 2007.
Ref Type: Report

(59) Cuesta-Herranz J. Problemática en el diagnóstico de la alergia a alimentos. Joint Symposium SEIAC-EAACI. *Alergol Immunol Clin* 2001; 16 (Extraordinario Núm. 2):116-36.

(60) Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, Harwanegg C, Hiller R, Rumpold H et al. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004; 32(3):249-54.

(61) Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S et al. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(1):7-13.

(62) Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16(3):414-6.

(63) Kim TE, Park SW, Cho NY, Choi SY, Yong TS, Nahm BH et al. Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp Mol Med* 2002; 34(2):152-8.

(64) Shreffler WG, Beyer K, Chu TH, Burks AW, Sampson HA. Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113(4):776-82.

(65) Matsuo H, Kohno K, Morita E. Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS J* 2005; 272(17):4431-8.

(66) Beyer K, Jarvinen KM, Bardina L, Mishoe M, Turjanmaa K, Niggemann B et al. IgE-binding peptides coupled to a commercial matrix as a diagnostic instrument for persistent cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(3):704-5.

(67) Durham SR. Allergen immunotherapy (desensitisation) for allergic diseases. (1470-2118 (Print)).

(68) Nelson HS. Allergen immunotherapy: where is it now?(0091-6749 (Print)).

(69) Bolhaar ST FAU, Zuidmeer LF, Ma YF, Ferreira FF, Bruijnzeel-Koomen CA FAU - Hoffmann-Sommergruber, Hoffmann-Sommergruber KF et al. A mutant of the major apple allergen, Mal d 1, demonstrating hypo-allergenicity in the target organ by double-blind placebo-controlled food challenge.(0954-7894 (Print)).

(70) Sudowe S FAU - Montermann, Montermann E FAU - Steitz, Steitz JF, Tuting TF, Knop JF, Reske-Kunz AB. Efficacy of recombinant adenovirus as vector for allergen gene therapy in a mouse model of type I allergy.(0969-7128 (Print)).

(71) Slater JE FAU, Paupore E FAU - Zhang, Zhang YT FAU - Colberg-Poley, Colberg-Poley AM. The latex allergen Hev b 5 transcript is widely distributed after subcutaneous injection in BALB/c mice of its DNA vaccine.(0091-6749 (Print)).

(72) Hartl AF, Kiesslich JF, Weiss RF, Bernhaupt AF, Mostböck S FAU - Scheiblhofer, Scheiblhofer S FAU - Ebner et al. Immune responses after immunization with plasmid DNA encoding Bet v 1, the major allergen of birch pollen.(0091-6749 (Print)).

(73) Toda MF, Kasai MF, Hosokawa HF, Nakano NF, Taniguchi YF, Inouye S FAU - Kaminogawa S et al. DNA vaccine using invariant chain gene for delivery of CD4+ T cell epitope peptide derived from Japanese cedar pollen allergen inhibits allergen-specific IgE response.(0014-2980 (Print)).

(74) Tighe HF, Takabayashi KF, Schwartz DF, Van Nest GF, Tuck S FAU - Eiden, Eiden JJ FAU - Kagey-Sobotka et al. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity.(0091-6749 (Print)).

(75) Broide DH. Immunostimulatory sequences of DNA and conjugates in the treatment of allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5(3):182-5.

(76) Casale TB, Condemi J, LaForce C, Nayak A, Rowe M, Watrous M et al. Effect of omalizumab on symptoms of seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 286(23):2956-67.

(77) Schramm G, Kahlert H, Suck R, Weber B, Stuwe HT, Muller WD et al. "Allergen engineering": variants of the timothy grass pollen allergen Phl p 5b with reduced IgE-binding capacity but conserved T cell reactivity. *J Immunol* 1999; 162(4):2406-14.

(78) Jahn-Schmid B, Kelemen P, Himly M, Bohle B, Fischer G, Ferreira F et al. The T cell response to Art v 1, the major mugwort pollen allergen, is dominated by one epitope. *J Immunol* 2002; 169(10):6005-11.

(79) Gonzalez EM, Villalba M, Quiralte J, Batanero E, Roncal F, Albar JP et al. Analysis of IgE and IgG B-cell immunodominant regions of Ole e 1, the main allergen from olive pollen. *Mol Immunol* 2006; 43(6):570-8.

(80) Lai HY, Tam MF, Chou H, Lee SS, Tai HY, Shen HD. Molecular and structural analysis of immunoglobulin E-binding epitopes of Pen ch 13, an alkaline serine protease major allergen from *Penicillium chrysogenum*. *Clin Exp Allergy* 2004; 34(12):1926-33.

(81) Suphioglu C, Blaher B, Rolland JM, McCluskey J, Schappi G, Kenrick J et al. Molecular basis of IgE-recognition of Lol p 5, a major allergen of rye-grass pollen. *Mol Immunol* 1998; 35(5):293-305.

(82) Lopez-Torreon G, Díaz-Perales A, Rodriguez J, Sanchez-Monge R, Crespo JF, Salcedo G et al. An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(6):1481-8.

(83) Klinglmayr E, Hauser M, Zimmermann F, Dissertori O, Lackner P, Wopfner N et al. Identification of B-cell epitopes of Bet v 1 involved in cross-reactivity with food allergens. *Allergy* 2009; 64(4):647-51.

(84) Yip YL, Ward RL. Epitope discovery using monoclonal antibodies and phage peptide libraries. *Comb Chem High Throughput Screen* 1999; 2(3):125-38.

(85) Pacios LF, Tordesillas L, Cuesta-Herranz J, Compes E, Sanchez-Monge R, Palacin A et al. Mimotope mapping as a complementary strategy to define allergen IgE-epitopes: peach Pru p 3 allergen as a model. *Mol Immunol* 2008; 45(8):2269-76.

(86) Meola A, Delmastro P, Monaci P, Luzzago A, Nicosia A, Felici F et al. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immunol* 1995; 154(7):3162-72.

- (87) Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Gronlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999; 29(7):896-904.
- (88) Valenta R, Steinberger P, Duchene M, Kraft D. Immunological and structural similarities among allergens: prerequisite for a specific and component-based therapy of allergy. *Immunol Cell Biol* 1996; 74(2):187-94.
- (89) Heiss S, Mahler V, Steiner R, Spitzauer S, Schweiger C, Kraft D et al. Component-resolved diagnosis (CRD) of type I allergy with recombinant grass and tree pollen allergens by skin testing. *J Invest Dermatol* 1999; 113(5):830-7.
- (90) Mullins RJ. Paediatric food allergy trends in a community-based specialist allergy practice, 1995-2006. *Med J Aust* 2007; 186(12):618-21.
- (91) Anderson LB, Jr., Dreyfuss EM, Logan J, Johnstone DE, Glaser J. Melon and banana sensitivity coincident with ragweed pollinosis. *J Allergy* 1970; 45(5):310-9.
- (92) Rodriguez J, Crespo JF, Burks W, Rivas-Plata C, Fernandez-Anaya S, Vives R et al. Randomized, double-blind, crossover challenge study in 53 subjects reporting adverse reactions to melon (*Cucumis melo*). *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(5):968-72.
- (93) Bircher AJ, Van MG, Haller E, Curty B, Frei PC. IgE to food allergens are highly prevalent in patients allergic to pollens, with and without symptoms of food allergy. *Clin Exp Allergy* 1994; 24(4):367-74.
- (94) Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy* 1988; 61(6 Pt 2):47-52.
- (95) Garcia Ortiz JC, Cosmes MP, Lopez-Asunolo A. Melon sensitivity shares allergens with *Plantago* and grass pollens. *Allergy* 1995; 50(3):269-73.
- (96) Cuesta-Herranz J, Lazaro M, Figueredo E, Igea JM, Umpierrez A, De-Las-Heras M. Allergy to plant-derived fresh foods in a birch- and ragweed-free area. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(10):1411-6.
- (97) Brehler R, Theissen U, Mohr C, Luger T. "Latex-fruit syndrome": frequency of cross-reacting IgE antibodies. *Allergy* 1997; 52(4):404-10.
- (98) Cuesta-Herranz J, Pastor C, Figueredo E, Vidarte L, de las HM, Duran C et al. Identification of Cucumisin (Cuc m 1), a subtilisin-like endopeptidase, as the major allergen of melon fruit. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(6):827-33.
- (99) Lopez-Torreon G, Crespo JF, Sanchez-Monge R, Sanchez-Jimenez M, Alvarez J, Rodriguez J et al. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(8):1065-72.

- (100) Yamagata H, Masuzawa T, Nagaoka Y, Ohnishi T, Iwasaki T. Cucumisin, a serine protease from melon fruits, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *J Biol Chem* 1994; 269(52):32725-31.
- (101) Asensio T, Crespo JF, Sanchez-Monge R, Lopez-Torrejon G, Somoza ML, Rodriguez J et al. Novel plant pathogenesis-related protein family involved in food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(4):896-9.
- (102) Enberg RN, Leickly FE, McCullough J, Bailey J, Ownby DR. Watermelon and ragweed share allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79(6):867-75.
- (103) Enberg RN, McCullough J, Ownby DR. Antibody responses in watermelon sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82(5 Pt 1):795-800.
- (104) Jordan-Wagner DL, Whisman BA, Goetz DW. Cross-allergenicity among celery, cucumber, carrot, and watermelon. *Ann Allergy* 1993; 71(1):70-9.
- (105) Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, Amato S, Zanoni D, Barocchi F et al. Detection of clinical markers of sensitization to profilin in patients allergic to plant-derived foods. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(2):427-32.
- (106) Martinez A, Fernandez-Rivas M, Martinez J, Palacios R. Improvement of fruit allergenic extracts for immunoblotting experiments. *Allergy* 1997; 52(2):155-61.
- (107) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- (108) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-5.
- (109) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9):4350-4.
- (110) Barrio E, Anton LC, Marques G, Sanchez A, Vivanco F. Formation of covalently linked C3-C3 dimers on IgG immune aggregates. *Eur J Immunol* 1991; 21(2):343-9.
- (111) Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(25):14440-5.

- (112) Gobom J, Mueller M, Egelhofer V, Theiss D, Lehrach H, Nordhoff E. A calibration method that simplifies and improves accurate determination of peptide molecular masses by MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 2002; 74(15):3915-23.
- (113) Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13):3381-5.
- (114) Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006; 22(2):195-201.
- (115) Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; 18(15):2714-23.
- (116) Dreborg S, Foucard T. Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy* 1983; 38(3):167-72.
- (117) Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Subcommittee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1989; 44 Suppl 10:1-59.
- (118) Anton LC, Alcolea JM, Sanchez-Corral P, Marques G, Sanchez A, Vivanco F. C3 binds covalently to the C gamma 3 domain of IgG immune aggregates during complement activation by the alternative pathway. *Biochem J* 1989; 257(3):831-8.
- (119) Anton LC, Ruiz S, Barrio E, Marques G, Sanchez A, Vivanco F. C3 binds with similar efficiency to Fab and Fc regions of IgG immune aggregates. *Eur J Immunol* 1994; 24(3):599-604.
- (120) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: Nolan C, editor. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- (121) Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ, McCawley P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 1977; 13(4):213-7.
- (122) Figueredo E, Cuesta-Herranz J, De-Miguel J, Lazaro M, Sastre J, Quirce S et al. Clinical characteristics of melon (*Cucumis melo*) allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 91(3):303-8.
- (123) Cuesta-Herranz J, Lazaro M, de las HM, Lluch M, Figueredo E, Umpierrez A et al. Peach allergy pattern: experience in 70 patients. *Allergy* 1998; 53(1):78-82.

(124) Egger M, Mutschlechner S, Wopfner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy* 2006; 61(4):461-76.

(125) Cuesta-Herranz J, Lazaro M, Martinez A, Figueredo E, Palacios R, De-Las-Heras M et al. Pollen allergy in peach-allergic patients: sensitization and cross-reactivity to taxonomically unrelated pollens. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(3 Pt 1):688-94.

(126) EAACI Subcommittee of skin tests and allergen standarization. Allergen standarization and skin tests. *Allergy* 1993; 48 (suppl 14).

(127) Scheurer S, Wangorsch A, Haustein D, Vieths S. Cloning of the minor allergen Api g 4 profilin from celery (*Apium graveolens*) and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(7):962-71.

(128) Asero R, Monsalve R, Barber D. Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(6):1033-7.

(129) Vieths S, Schoning B, Petersen A. Characterization of the 18-kDa apple allergen by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 104(4):399-404.

(130) Breiteneder H, Ebner C. Atopic allergens of plant foods. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; 1(3):261-7.

(131) Onishi Y, Kuroda M, Yasueda H, Saito A, Sono-Koyama E, Tunasawa S et al. Two-dimensional electrophoresis of *Malassezia* allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f 4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 1999; 261(1):148-54.

(132) Benndorf D, Muller A, Bock K, Manuwald O, Herbarth O, von BM. Identification of spore allergens from the indoor mould *Aspergillus versicolor*. *Allergy* 2008; 63(4):454-60.

(133) Luengo O, Molla R, Gamez C, Cardona V, Lopez E, Sastre B et al. Allergenicity and cross-reactivity of *Senecio* pollen: identification of novel allergens using the immunoproteomics approach. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(6):1048-60.

(134) Posch A, Chen Z, Dunn MJ, Wheeler CH, Petersen A, Leubner-Metzger G et al. Latex allergen database. *Electrophoresis* 1997; 18(15):2803-10.

(135) Rozynek P, Sander I, Appenzeller U, Cramer R, Baur X, Clarke B et al. TPIS--an IgE-binding wheat protein. *Allergy* 2002; 57(5):463.

- (136) Hoppe S, Steinhart H, Paschke A. Identification of a 28 kDa lychee allergen as a triose-phosphate isomerase. *Food and Agricultural Immunology* 2006; 17(1):9-19.
- (137) Chen YH, Lee MF, Lan JL, Chen CS, Wang HL, Hwang GY et al. Hypersensitivity to *Forcipomyia taiwana* (biting midge): clinical analysis and identification of major For t 1, For t 2 and For t 3 allergens. *Allergy* 2005; 60(12):1518-23.
- (138) Vallverdu A, Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez A, Martinez J et al. Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin). *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(3):363-70.
- (139) Lopez-Torrejon G, Ibanez MD, Ahrazem O, Sanchez-Monge R, Sastre J, Lombardero M et al. Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen. *Allergy* 2005; 60(11):1424-9.
- (140) Wensing M, Akkerdaas JH, van Leeuwen WA, Stapel SO, Bruijnzeel-Koomen CA, Aalberse RC et al. IgE to Bet v 1 and profilin: cross-reactivity patterns and clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110(3):435-42.
- (141) Fernandez-Rivas M, Gonzalez-Mancebo E, Rodriguez-Perez R, Benito C, Sanchez-Monge R, Salcedo G et al. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112(4):789-95.
- (142) Vidali L, Perez HE, Valdes L, V, Noguez R, Zamudio F, Sanchez F. Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* 1995; 108(1):115-23.
- (143) Pokoj S, Lauer I, Fotisch K, Himly M, Mari A, Enrique E et al. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer proteins. *Protein Expr Purif* 2009.
- (144) Tawde P, Venkatesh YP, Wang F, Teuber SS, Sathe SK, Roux KH. Cloning and characterization of profilin (Pru du 4), a cross-reactive almond (*Prunus dulcis*) allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(4):915-22.
- (145) Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F et al. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(7):920-9.
- (146) Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Díaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771(6):781-91.

(147) Van Ree R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(Pt 6):910-3.

(148) Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(3):608-13.

(149) Ferreira F, Briza P, Infuhr D, Schmidt G, Wallner M, Wopfner N et al. Modified recombinant allergens for safer immunotherapy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006; 5(1):5-14.

(150) Ball T, Sperr WR, Valent P, Lidholm J, Spitzauer S, Ebner C et al. Induction of antibody responses to new B cell epitopes indicates vaccination character of allergen immunotherapy. *Eur J Immunol* 1999; 29(6):2026-36.

(151) Moverare R, Elfman L, Vesterinen E, Metso T, Haahtela T. Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System. *Allergy* 2002; 57(5):423-30.

(152) Egger M, Hauser M, Himly M, Wopfner N, Wallner M, Ferreira F. Development of recombinant allergens for diagnosis and therapy. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009; 1:77-90.

(153) Radauer C, Willeroider M, Fuchs H, Hoffmann-Sommergruber K, Thalhamer J, Ferreira F et al. Cross-reactive and species-specific immunoglobulin E epitopes of plant profilins: an experimental and structure-based analysis. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(7):920-9.

(154) Akdis CA, Blesken T, Wymann D, Akdis M, Blaser K. Differential regulation of human T cell cytokine patterns and IgE and IgG4 responses by conformational antigen variants. *Eur J Immunol* 1998; 28(3):914-25.

(155) Ferreira F, Ebner C, Kramer B, Casari G, Briza P, Kungl AJ et al. Modulation of IgE reactivity of allergens by site-directed mutagenesis: potential use of hypoallergenic variants for immunotherapy. *FASEB J* 1998; 12(2):231-42.

(156) Maurer D, Ebner C, Reininger B, Fiebiger E, Kraft D, Kinet JP et al. The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. *J Immunol* 1995; 154(12):6285-90.

(157) van der Heijden FL, Joost van Neerven RJ, van KM, Bos JD, Kapsenberg ML. Serum-IgE-facilitated allergen presentation in atopic disease. *J Immunol* 1993; 150(8 Pt 1):3643-50.

(158) Shalom G, Pratten J, Wilson M, Nair SP. Cloning, heterologous gene expression and biochemical characterization of the alpha-1,3-glucanase from the

filamentous fungus *Penicillium purpurogenum*. *Protein Expr Purif* 2008; 60(2):170-5.

(159) Miller DW, Safer P, Miller LK. *Genetics Engineering. An insect baculovirus host vector for high-level expression of foreign genes*. Plenum New York ed. 1986.

(160) Luckow VA, Summers MD. Trends in the development of baculoviral expression vectors. *Biotechnology* 1988; 6:47-57.

(161) Carbonel LF, Klowden MJ, Miller LK. Baculovirus mediated expression of bacterial genes in *depetran* and mammalian cells. *J Virol* 1985; 56:153-60.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACION BÁSICA Y OBJETIVO

Por la presente, se le solicita su participación en un estudio para estudiar los marcadores de riesgo de alergia a nuevos alimentos en pacientes alérgicos a sandía, a la cual usted es alérgico, y que dirige el Dr. Javier Cuesta Herranz, Jefe Asociado del Servicio de Alergia de la Fundación Jiménez Díaz.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Si es usted alérgico a sandía y decidiera participar en el estudio, su participación consistiría únicamente en una extracción de sangre, aproximadamente 40 cc.

RIESGOS Y BENEFICIOS

Las pruebas se realizarán utilizando el suero extraído y por lo tanto no existe ningún riesgo para el paciente. Los beneficios que obtiene por su participación se derivan de la identificación de los marcadores que indiquen alergia a nuevos alimentos. Además, participando en este estudio contribuye a la investigación tanto en el campo de las causas de la alergia alimentaria como a mejorar el diagnóstico y hacer posible el uso de nuevos tratamientos para esta enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD

Los datos derivados de su participación en el estudio se facilitarán al promotor del estudio y solo aparecerán sus iniciales y no su nombre. Es posible que el promotor y las autoridades sanitarias, necesiten revisar su historia médica para confirmar la información recogida. Su nombre nunca aparecerá en ningún informe, salvo en el que se le entregue. Los promotores del estudio, en cumplimiento de la ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le informa que sus datos personales serán incluidos en ficheros informatizados de datos de carácter personal y titularidad de la Fundación Jiménez Díaz, responsable del tratamiento y destinataria de los datos. Puede ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición previstos en la Ley, a los promotores del estudio, en el Servicio de la Alergia de la Fundación Jiménez Díaz, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid.

Los promotores del estudio tienen la obligación de secreto de los datos y el deber de guardarlos, y adoptara las medidas necesarias para evitar su alteración, perdida o acceso no autorizado.

En cualquier caso, los promotores del estudio garantizan que en la utilización de sus datos personales se observarán escrupulosamente las obligaciones establecidas en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y Real decreto 994/1999, de 11 de junio, por el que se aprueba el reglamento de medidas de seguridad de los ficheros automatizados que contengan datos de carácter personal, así como en el restante ordenamiento aplicable donde se establecen garantías y cautelas en cuanto al tratamiento de los datos de carácter personal.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Su participación en este estudio es voluntaria y puede consultarla con otras personas, (familiares, amigos, médico de familia, etc.) antes de otorgar su consentimiento. En caso de que decidiera no participar, no perdería ninguno de los beneficios de atención sanitaria a los que tiene derecho.

DECLARACIÓN DEL PACIENTE

Otorgo voluntariamente mi consentimiento a participar en este estudio. He leído y comprendido este documento de consentimiento informado y los riesgos que en él se describen. Comprendo que puedo retirar mi consentimiento o retirarme de este estudio en cualquier momento sin pérdida alguna de los beneficios a los que tengo derecho.

Firma del voluntario

Firma del investigador

Fecha (día/mes/año)

Trabajos publicados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

(1) Pastor C, Cuesta-Herranz J, Cases B, Perez-Gordo M, Figueredo E, de las Heras M et al. **Identification of Major Allergens in Watermelon.** Int Arch Allergy Immunol 2009; 149(4):291-8.

(2) Perez-Gordo M, Sanchez-Garcia S, Cases B, Pastor C, Vivanco F, Cuesta-Herranz J. **Identification of vitellogenin as an allergen in Beluga caviar allergy.** Allergy 2008; 63(4):479-80.

(3) Gonzalez de Olano D, Pastor VC, Cases Ortega B, Perez-Gordo M, Moral D, V, Vivanco F et al. **Identification of a novel 17-kDa protein as a ferret allergen.** Ann Allergy Asthma Immunol 2009; 103(2):177-8.

(4) Perez-Gordo M, Sanchez-Garcia S, Cases B, Pastor C, Vivanco F, Cuesta-Herranz J. **Mujer de 50 años con alergia en Nochevieja.** ISSN: 1696-408X. ISBN: 978-84-7989-494-8. 2007: 253-6.

(5) Gonzalez De Olano D, Gonzalez-Mancebo E, Santos Macadan S, Gandolfo Cano M, Perez-Gordo M, Cases B, Vivanco F, Pastor C. **Allergy to Pumpkin with Cyclophilin as the relevant Allergen.** Annals of Allergy, Asthma & Immunology 2009. In press.

(6) Gonzalez De Olano D, Bartolome B, Cases B, Perez-Gordo M, Vivanco F, Pastor C. **Allergy to Prairie Dog Lipocalins.** Annals of Allergy, Asthma & Immunology 2009. In press.

(7) Cases B, Pastor C, Gil Dones F, Perez-Gordo M, Maroto S. A, de las Heras M, Vivanco F, Cuesta-Herranz J. **Watermelon Profilin: Characterization of a Major Allergen as a model for plant-derived foods profilins.** Int Arch Allergy Immunol. Artículo en revisión.

(8) Cases B, García-Ara C, Boyano M.T, Pérez-Gordo M, Pedrosa M, Vivanco F, Quirce S, Pastor C. **Phosphorylation avoids IgE binding to cow's casein in children with milk allergy. Implication of casein phosphorylation in milk allergy.** *Pediatr Allergy Immunol.* Artículo en revisión.